

ARTÍCULO DE REVISIÓN

DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO BASADO EN ADN LIBRE FETAL: ACTUALIZACIÓN

Walter Ricardo Ventura Laveriano^{1,2}

¹ Past Fellow Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, Londres, Reino Unido

² Unidad de Medicina Fetal, Departamento de Obstetricia y Perinatología, Instituto Nacional Materno Perinatal, Lima, Perú

Esta revisión es parte de una conferencia presentada en el VIII Congreso Internacional de la Sociedad Peruana de Ultrasonido en Obstetricia y Ginecología, 22 de Noviembre del 2013, Lima, Perú

Artículo recibido el 24 de junio de 2014 y aceptado para publicación el 8 de julio de 2014.

Correspondencia:
Dr. Walter Ventura
Unidad de Medicina Fetal, Instituto Nacional Materno Perinatal
Av. Miroquesada 941, Lima, Perú
Teléfono: 328 8078. Anexo 1394

✉ walterichard@hotmail.com

RESUMEN

El descubrimiento del ADN libre fetal circulando en sangre materna ha revolucionado la práctica de la Obstetricia y cambiado el paradigma del diagnóstico prenatal. En los últimos 5 años hemos avanzado del tamizaje de aneuploidías con muchos falsos positivos a uno mucho más efectivo y con cifras de falsos positivos muy bajas. Este es, sin duda, el mejor método de tamizaje actual que se tiene en Obstetricia.

Palabras clave: ADN libre fetal, diagnóstico prenatal, aneuploidía, trisomía 21.

NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS BASED ON CELL-FREE FETAL DNA:

UPDATE

ABSTRACT

The discovery of cell free fetal DNA (cff-DNA) in maternal circulation has profoundly changed the clinical practice of Obstetrics and knocked down an old paradigm in prenatal diagnosis. Over the past five years screening for chromosomal abnormalities has moved from one with a high false positive rate into another more effective and at lower false positive rate. Undoubtedly, this test is the best effective screening tool in Obstetrics.

Keywords: Cell-free fetal DNA, prenatal diagnosis, aneuploidy, trisomy 21.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal ha dado grandes pasos en los últimos 10 años. Gracias al descubrimiento del ADN libre circulando en sangre materna, hoy se puede aislar este ADN libre fetal y secuenciar parte del genoma que sea de interés clínico, o incluso secuenciar todo el genoma fetal, pudiéndose diagnosticar virtualmente todas las alteraciones genéticas hasta hoy identificadas e incluso alteraciones genéticas puntuales de significado incierto o que aún no tienen correlato clínico⁽¹⁾. El objetivo de esta corta revisión es presentar una actualización sobre lo que se viene haciendo en el mundo con esta nueva tecnología, particularmente en el tamizaje de trisomía 21.

Durante décadas, gran parte de los esfuerzos del diagnóstico prenatal ha estado orientado a identificar fetos con aneuploidía. La aneuploidía es un término que hace referencia a un número anormal de cromosomas en las células de los humanos. La aneuploidía más común es la trisomía 21, que afecta aproximadamente a 1/700 embarazos a término. Le siguen en frecuencia la trisomía 18 (1/6 000) y trisomía 13 (1/10 000)⁽²⁾. En la década de los 60, se empezaron a realizar los primeros cariotipos fetales en el líquido amniótico, lo que llevó a reportar los primeros casos de diagnóstico prenatal de aneuploidías. Quedaba entonces la tarea de empezar algún método de cribado. Por los trabajos de G. Shuttleworth se sabía que a mayor edad de las gestantes, mayor era el riesgo de presentar un feto con trisomía 21⁽³⁾.



Basado en estas observaciones, hacia la década de los 70 se consideró la edad materna mayor de 35 años el único método de cribado de trisomía 21, de tal forma que las gestantes mayores de 35 años eran consideradas de riesgo y por lo tanto se les ofrecía la prueba diagnóstica, principalmente amniocentesis. Sin embargo, este método de tamizaje, basado en la edad materna, solo permitía detectar no más de 30% de fetos afectados con trisomía 21, por lo que los investigadores siguieron en la búsqueda de mejores métodos de detección⁽⁴⁾.

Es así que durante la década de los 80 se popularizó el método bioquímico o prueba triple (*triple test*), que mide la presencia de tres hormonas: estriol no conjugado, BhCG (sub unidad beta de la hormona gonadotropina coriónica) y AFP (alfa-feto proteína)⁽⁵⁾. En algunas partes del mundo se adiciona la medición de inhibina A o prueba cuádruple (*quadruple test*). Con este método de tamizaje se logra una detección de 60 a 70%, pero aún con una tasa de falsos positivos de 5%⁽⁶⁾.

La década de los 90 fue clave, porque se pasó del método bioquímico realizado en el segundo trimestre al método ecográfico, que podía ser realizado en el primer trimestre. Es decir, se podía ofrecer por primera vez un tamizaje muy temprano, entre la semana 11 y 13. Fueron los trabajos pioneros del Profesor Kypros Nicolaides, en el Reino Unido, basados en la medición de lo que hoy se conoce como translucencia nucal, los que marcaron un hito en el diagnóstico prenatal. Por primera vez se tenía un método de tamizaje de trisomía 21 que ofrecía tasa de detección hasta de 75% y que, más aún, cuando se combina con la medición de dos hormonas del suero materno, también en el primer trimestre (BhCG libre y PAPP-A), se aumenta las tasas de detección hasta en 90%⁽⁷⁾. Lamentablemente, esta forma de tamizaje nunca llegó al Perú y lo que ofrecemos a nuestras gestantes hoy es un tamizaje partido, basado en la translucencia nucal y solo a un segmento de la población, incluyendo marcadores ecográficos adicionales que solo han sido validados cuando se les combina con los marcadores bioquímicos. Desafortunadamente, parte aún de los profesionales de la salud y de la población entienden a esta prueba como 'diagnóstico genético' y no como un tamizaje ecográfico de trisomía 21. Un tamizaje similar a lo que el Papanicolaou lo es al cáncer cervical.

El diagnóstico prenatal es más que ecografía y hoy tenemos la opción de contar con pruebas no invasivas que permitirán afinar mucho más el diagnóstico prenatal. Sin duda, estamos viviendo un cambio de paradigma pocas veces visto en Medicina.

EL ADN FETAL LIBRE

Hoy se puede obtener ADN fetal libre, esto es, fragmentos cortos de ADN que no están unidos a células, proteínas o transportadores, y que son liberados directamente de la placenta a la circulación materna. Una de las características de este ADN libre es que es específico del embarazo, es decir, tiene una vida media muy corta, de aproximadamente 15 minutos, siendo prácticamente indetectable a las 2 horas posparto, a diferencia de las células fetales, que fueron el foco de interés inicial del diagnóstico prenatal, y que persisten días o meses después de finalizado el embarazo.

Este ADN fetal es fácilmente aislado y resistente a la temperatura ambiente, lo cual lo hace práctico a la hora de manipulación en el laboratorio clínico⁽⁸⁾. Hoy se sabe que es exclusivamente derivado de las células placentarias, a pesar de llevar el nombre de ADN fetal. Se encuentra presente desde la cuarta semana de gestación y aumenta conforme avanza la gestación. Dennis Lo, en 1997, aisló por primera vez segmentos de ADN correspondiente al gen SRY (pertenecientes al cromosoma Y) en el plasma de gestantes portadoras de feto de sexo masculino⁽⁹⁾. Este experimento demostró al mundo que efectivamente existe ADN libre fetal circulando en sangre materna. Este fue el punto de inicio de un nuevo horizonte en Obstetricia.

APLICACIONES DEL ADN LIBRE FETAL

Determinación del genotipo RHD fetal

Con el descubrimiento del ADN libre fetal en plasma materno, los autores visionaron la primera aplicación clínica de esta tecnología, evaluando el genotipo fetal RHD fetal para determinar si el feto es Rh positivo o negativo. Con tecnología simple de amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*) se logró determinar el genotipo fetal RhD en 55 de 57 mujeres Rh negativo⁽¹⁰⁾. Este experimento tuvo una trascendencia significativa, debido a que al conocer el genotipo



RhD fetal se puede indicar anti-D solo a aquellas mujeres portadoras de fetos Rh positivos, reduciendo el número innecesario de anti-D, así como el consiguiente ahorro y disminución de efectos adversos del anti-D. De hecho, este es una aplicación actual en países como el Reino Unido, Holanda y Dinamarca, donde las mujeres gestantes Rh negativas son sometidas a un análisis de genotipo fetal y solo las gestantes con fetos Rh positivos recibirán la vacuna anti-D⁽¹¹⁾.

Determinación del sexo fetal

La determinación del sexo fetal en el diagnóstico prenatal es de vital importancia para el manejo de enfermedades ligadas al cromosoma X o en casos de genitales ambiguos. Además, la determinación en gestantes del sexo fetal por riesgo de hiperplasia adrenal congénita permitiría seleccionar aquellas gestantes que se puedan beneficiar con esteroides para prevenir la masculinización de fetos de sexo femenino⁽¹²⁾.

Tamizaje de trisomía 21 y otras aneuploidías

Mientras que la determinación del genotipo y sexo fetal se puede lograr con PCR, la determinación de aneuploidías requiere otro enfoque que tardó años en desarrollarse. La aplicación del PCR digital permitió desarrollar el método cuantitativo, que es la base actual para la detección de aneuploidía basado en ADN libre fetal⁽¹³⁾. Sin embargo, el desarrollo de los métodos de secuenciación paralelo masivo que permiten contar millones de fragmentos de ADN en poco tiempo, permitieron dar el salto del laboratorio al escenario clínico. El principio es identificar los fragmentos de ADN fetal de los fragmentos de ADN materno; luego, estos se comparan con el genoma humano y se ubican según el tipo de cromosoma. Un feto con dos cromosomas del par 21 siempre tendrá una proporción constante de cromosoma 21, mientras que un feto con un cromosoma extra del par 21 (trisomía 21) tendrá una proporción mayor. Esa diferencia es detectada por modelos matemáticos por medio del uso de la bioinformática, y es reportada como positiva (riesgo alto) o negativa (riesgo bajo) en caso de no existir diferencia. Se entiende entonces que este método no es diagnóstico, porque no lee un cariotipo; es un método de tamizaje con tasa alta de detección y tasa muy baja de falso positivo. Para poder dar un resultado confiable, se necesita que la fracción de ADN fetal

(relación ADN fetal/ADN materno) sea por lo menos mayor del 5%. Mientras más alta sea la fracción, la probabilidad de dar un falso negativo se acerca a cero.

En el 2008, dos estudios de dos grupos de investigadores diferentes, publicados solo con dos meses de diferencia, mostraban al mundo que se podía diagnosticar trisomía 21 usando el secuenciación masivo paralelo^(14,15). En los años sucesivos publicaron varios estudios reportando tasas de detección similares de más de 99,5% de detección de trisomía 21 y con una tasa de falsos positivos de 0,1%. Gracias a estos estudios, en octubre de 2011, la compañía Sequenon Inc. lanzó al mercado norteamericano el primer producto comercial de tamizaje no invasivo de trisomía 21 en sangre materna, ofreciendo una tasa de detección hasta entonces impensable de 99,5% y tasas de falsos positivos muy reducidos de 0,1%⁽¹⁶⁾. Este fue el día en que cambió el diagnóstico prenatal; el día en que cambió el viejo paradigma de tamizaje de aneuploidías basado en la edad materna y hallazgos ecográficos y/o bioquímicos a una sola prueba de sangre materna no invasiva con tasas tan altas que bien podrían ser consideradas de diagnóstico. Lo que es mejor aún, esta prueba puede ofrecerse tan temprano como las 10 semanas de gestación. El Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) y la Sociedad Internacional de Diagnóstico Prenatal (ISPD) se han pronunciado y recomiendan informar de la existencia de esta prueba a las gestantes de alto riesgo y que los resultados deben ser confirmados con una prueba invasiva⁽¹⁷⁾.

La pregunta siguiente es que si esta prueba es altamente efectiva en poblaciones de riesgo alto entonces también lo será en poblaciones de riesgo bajo. Existe un estudio actual que responde muy bien a esta pregunta, que fue llevado a cabo en una población de 2 049 gestantes no seleccionadas que acudían normalmente a un programa de tamizaje del primer trimestre, entre las 11 y 13 semanas⁽¹⁸⁾. En este estudio, la incidencia de trisomía 21 fue de 8 casos y de trisomía 18 de 2 casos, que es lo que normalmente se observa en la población general. Sorprendentemente, el ADN libre fetal permitió detectar los 8 casos de trisomía 21 y los 2 casos de trisomía 18; es decir, se tuvo tasa de detección de 100%⁽¹⁸⁾. Sin embargo, aún hay cierta resistencia acerca de la utilidad de esta prueba en poblaciones de



riesgo bajo. Una de las razones argumentadas en contra de su uso rutinario es el valor predictivo positivo bajo de esta prueba. No obstante, debemos de recordar que el valor predictivo de una prueba dependerá de la prevalencia de la enfermedad que se quiere tamizar; es decir, al ser Síndrome de Down una enfermedad poco prevalente (1/700), cualquier prueba de tamizaje prenatal de esta condición tendrá un valor predictivo positivo muy bajo, lo cual no la desacredita para nada en un contexto de tamizaje universal. El otro argumento es el precio. Sin embargo, los médicos estamos obligados a informar de las opciones y no prejuzgar a las pacientes asumiendo que no puedan pagar el costo y por lo tanto no deben saber de que existen estas pruebas, hoy disponibles no solo en el mercado internacional sino también en nuestro país. Esta tecnología ya se comercializa en Perú. La muestra es tomada por los laboratorios locales y seguidamente enviada a los laboratorios de las diferentes compañías en San Diego, California, y luego de 10 días se tiene los resultados finales. Nosotros publicamos un artículo en la revista de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) expresando que los países en vías de desarrollo como el nuestro no pueden estar ajenos a estas tecnologías. Por el contrario, deberíamos estar atentos a los nuevos alcances en diagnóstico prenatal del ADN libre y ofrecer un abanico más ampliado de posibilidades diagnósticas a nuestros pacientes⁽¹⁹⁾. El problema que nosotros vemos de por qué no se ha generalizado su uso en nuestro país, es no por el alto precio de la prueba, sino por la falta de una política y conocimiento por parte de médicos y pacientes del tamizaje del primer trimestre en nuestro país. Estas pruebas se están indicando mucho en países que tienen políticas de salud que incluye tamizaje del primer trimestre.

Cabe mencionar que la tasa de detección de trisomía 18 y 13 no ha sido la esperada y esto es por ciertas dificultades técnicas inherentes a estos cromosomas, que seguramente en un futuro cercano serán superadas.

EL FUTURO

El diagnóstico prenatal es un ejemplo claro de medicina traslacional, de cómo se puede llevar rápidamente una prueba estudiada y probada en un laboratorio experimental al escenario clínico. Definitivamente, el ADN fetal libre en san-

gre materna será utilizado en un futuro para el diagnóstico de enfermedades monogénicas que afectan al ser humano y se constituirá en la base de lo que ya se denomina medicina fetal personalizada a través de la determinación del genoma fetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bianchi DW. Prenatal diagnostics: Fetal genes in mother's blood. *Nature*. 2012;487:304-5. DOI: 10.1038/487304a.
2. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2012;31: 7-15. DOI: 10.1002/pd.2637.
3. Shuttleworth GE. Clinical lecture on idiocy and imbecility. *Br Med J*. 1886;1:183-6.
4. Ferguson-Smith MA. Maternal age and Down syndrome. *Lancet*. 1978;2:213. DOI: S0140-6736(78)91958-X [pii].
5. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Canick JA. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ*. 1988;297:883-7.
6. Wald NJ, Huttly WJ, Hackshaw AK. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet*. 2003;361:835-6. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12680-3.
7. Nazario-Redondo C, Ventura-Laveriano J, Flores-Molina E, Ventura W. La importancia de la ecografía a las 11+0 a 13+6 semanas de embarazo. *Actualización. An Fac med*. 2011;72:211-5.
8. Lo YM, 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(4):768-75. DOI: 10.1086/301800.
9. Lo YM, 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
10. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *NEJM*. 1998;339(24):1734-8. DOI: 10.1056/NEJM199812103392402.



11. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de Haas M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG*. 2011;118:1340-8. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2011.03028.x.
12. Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, Daniels G, Chitty LS. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet*. 2011;80:68-75. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01533.x.
13. Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Analyt Chem*. 2007;79(19):7576-9. DOI: 10.1021/ac0709394.
14. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(51):20458-63. DOI: 10.1073/pnas.0810641105.
15. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(42):16266-71. DOI: 10.1073/pnas.0808319105
16. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenatal diagnosis*. 2013;33:521-31. DOI: 10.1002/pd.4101.
17. ACOG. Committee Opinion no. 545: noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2012;120:1532-4. DOI: 10.1097/01.AOG.0000423819.85283.f4 00006250-201212000-00047 [pii].
18. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(5):374 e1-6. DOI: doi: 10.1016/j.ajog.2012.08.033.
19. Ventura W, Nazario-Redondo C, Sekizawa A. Non-invasive prenatal diagnosis from the perspective of a low-resource country. *Int J Gynaecol Obstet*. 2013;122:270-3. DOI: 10.1016/j.ijgo.2013.03.031. S0020-7292(13)00267-1 [pii].