

# Cribado prenatal de aneuploidías mediante análisis de ácido desoxirribonucleico libre total circulante en plasma materno.

## Revisión narrativa.

 Alisandra Morales de Machín<sup>1</sup>,  Enrique Machín Cáceres<sup>2</sup>.

### RESUMEN

*La prueba prenatal no invasiva es un método de cribado de aneuploidías fetales y de resultar con riesgo alto debe ser confirmado a través de prueba genética diagnóstica. Es la prueba de detección más sensible y específica para las aneuploidías fetales comunes y minimiza la realización de técnicas invasivas, solo para las gestantes con riesgo elevado. Se debe realizar asesoramiento genético pre- y poscribado. Este estudio tiene como objetivo describir los fundamentos básicos de la prueba prenatal no invasiva mediante el análisis del ácido desoxirribonucleico libre circulante en plasma materno para cribado de aneuploidías, y de los métodos primordiales y avances en biología molecular incluyendo las tecnologías de secuenciación de nueva generación, que lo han facilitado, considerando sus beneficios y limitaciones al aplicarla en la práctica clínica, en este campo que cambia con tanta rapidez.*

**Palabras clave:** Cribado prenatal, Aneuploidías, Ácido desoxirribonucleico fetal libre, Avances en biología molecular, Secuenciación de nueva generación, Asesoramiento genético.

### ***Prenatal screening for aneuploidies by analysis of circulating total free deoxyribonucleic acid in maternal plasma. Narrative review***

### SUMMARY

*The non-invasive prenatal test is a screening method for fetal aneuploidies and if the result is at high risk, it must be confirmed through diagnostic genetic test. It is the most sensitive and specific detection test for common fetal aneuploidies and minimizes the use of invasive techniques, only for pregnant women at high risk. Genetic counseling should be performed before and after screening. This study aims to describe the basic fundamentals of non-invasive prenatal testing by analyzing free circulating deoxyribonucleic acid in maternal plasma for aneuploidy screening, and the primary methods and advances in molecular biology, including next-generation sequencing technologies, which have facilitated it, considering its benefits and limitations when applying it in clinical practice, in this rapidly changing field.*

**Keywords:** Prenatal screening, Aneuploidy, Free fetal deoxyribonucleic acid, Advances in molecular biology, Next generation sequencing, Genetic counseling.

## INTRODUCCIÓN

El término cribado o detección prenatal se utiliza para referirse a la realización de pruebas destinadas a detectar defectos congénitos, como anomalías cromosómicas (AC) tales como las aneuploidías;

defectos del tubo neural y otras anomalías estructurales en embarazos en los que no existe un mayor riesgo de defecto congénito. Son no invasivas y se basan en la obtención de una muestra de sangre materna o en pruebas de imagen, generalmente mediante ecografía. Están diseñadas para ser de bajo costo y con riesgo bajo, para que sean adecuadas a la hora de realizar el cribado de todas las mujeres embarazadas en una población, con independencia de su riesgo (1).

Los métodos de cribado prenatal de las AC utilizan métodos estadísticos basados en el concepto de riesgo para estimar la probabilidad de la presencia o

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Genéticas. Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela. <sup>2</sup>Clínica de ojos. Maracaibo. Venezuela. Correo de correspondencia: [alisandra\\_machin@hotmail.com](mailto:alisandra_machin@hotmail.com)

**Forma de citar este artículo:** Morales de Machín A, Machín Cáceres E. Cribado prenatal de aneuploidías mediante análisis de ácido desoxirribonucleico libre total circulante en plasma materno. Revisión. Rev Obstet Ginecol Venez. 84(2): 185-204. DOI: 10.51288/00840212

ausencia de las mismas y aplican un nivel de corte para separar la población cribada en dos grupos: uno con riesgo positivo y otro con riesgo negativo para la anomalía en cuestión (2). Deben mantener un rendimiento apropiado que tiene que ser evaluado mediante controles de calidad (3).

La evaluación de la eficacia, que mide la valoración teórica de un método de cribado prenatal de las aneuploidías, se realiza mediante modelos y simulaciones matemáticas que estiman la tasa de detección (TD) o sensibilidad (capacidad de la prueba de detectar la enfermedad cuando esta se encuentra presente) y la tasa de falsos positivos (TFP) utilizando, habitualmente, las técnicas de integración numérica o la simulación de Monte-Carlo. Para comparar los resultados que producen estos modelos para las distintas estrategias de cribado se suele expresar la TD para una TFP fija del 1 % o 5 %, o bien la TFP necesaria para conseguir una detección del 85 %, en una población concreta, o la detección y TFP que produce un determinado nivel de corte en el riesgo (2).

La evaluación de la efectividad o comportamiento en la práctica real, debe realizarse mediante estudios prospectivos, bien diseñados y, preferiblemente, no intervencionistas, con pacientes que incluyan individuos sanos y afectados de la enfermedad que se valora, con una prevalencia de estos últimos y distribución de edades lo más parecida a la habitual, y un método de confirmación de los casos verdaderamente positivos altamente preciso. Los resultados se expresan en TD y TFP que produce un determinado nivel de corte en el riesgo para la población estudiada (2).

Otro parámetro a tomar en cuenta es la especificidad (capacidad de la prueba de detectar ausencia de enfermedad cuando esta se encuentra ausente). La sensibilidad y la especificidad no varían con la prevalencia de la enfermedad (4).

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de que la enfermedad esté presente cuando el resultado de la prueba es positivo, y se expresa como el porcentaje de verdaderos enfermos entre los que tuvieron pruebas positivas. El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que la enfermedad no esté presente cuando el resultado de la prueba es negativo. Se expresa como el porcentaje de verdaderos sanos entre los que tuvieron pruebas negativas. La prevalencia de la enfermedad modifica el valor predictivo. Con una alta prevalencia, cabe esperar un alto VPP y con baja prevalencia, disminuye el VPP de la prueba. Se entiende por prevalencia el número de pacientes con la enfermedad que se desea diagnosticar, en relación al total de casos considerados al realizar la prueba (4).

La prevalencia de una determinada aneuploidía, en cada momento de la gestación, depende de la edad materna, del antecedente de un feto previamente afectado de dicha aneuploidía, y de la letalidad intrauterina que se produce para la misma, en el transcurso de la gestación (2).

Las aneuploidías fetales son una de las principales causas de muerte perinatal y discapacidad cognitiva, lo que ha llevado al desarrollo de esquemas de cribado prenatal con el fin de detectarlas tempranamente (1, 5).

Los procedimientos de cribado se basan en determinar los denominados marcadores de aneuploidía, es decir, parámetros biológicos, ecográficos, bioquímicos, de origen materno, fetal o placentario, que han demostrado presentar diferencias cuantitativas o cualitativas estadísticamente significativas, entre los fetos afectados y no afectados de un determinado tipo de aneuploidía, y puede realizarse durante el primer trimestre (1er T) de gestación, el segundo trimestre (2do T), o en ambos (2).

En la década de los 70, se introdujo la edad materna  $\geq$  de 35 años como cribado (4, 6) con TD del 30 %

con 5 % de TFP (5). La edad materna avanzada es un factor de riesgo para las aneuploidías, especialmente la trisomía (T) 21 o síndrome Down, T18 o síndrome Edward, T13 o síndrome Patau, y de las aneuploidías 47, XXX y 47, XXY (2, 7, 8).

Los métodos de cribado han ido evolucionando, pero todos utilizan, al menos, la edad materna y la edad gestacional como punto de partida, es decir, como riesgo *a priori*, que se ajusta por diversos factores correctores o cocientes de probabilidad, que dependen de los resultados de una serie de pruebas de cribado que se han llevado a cabo a lo largo del embarazo, para determinar el riesgo específico de cada paciente (3, 9). El teorema de Bayes permite combinar este riesgo con el riesgo *a priori* y, de este modo, obtener el riesgo final (2).

El riesgo *a priori* para la edad materna es el riesgo que presenta cualquier embarazada, debido a su edad, de tener un feto afectado de T21 para la edad que tendrá en la fecha probable del parto, o también en el momento del cribado, ya sea en el 1er o 2do T de la gestación y debe tenerse en cuenta la letalidad intrauterina o su recíproco, supervivencia intrauterina (10), que se produce durante toda la gestación, que es específica de cada aneuploidía (2).

El riesgo *a priori* de trisomía de una paciente que ha presentado un feto afectado de la misma en una gestación anterior es mayor que el esperado con base a su edad y es específico para cada AC. El riesgo *a priori* para la edad materna para T21 se incrementa aproximadamente un 0,75 % en el 1er T, un 0,54 % en el 2do T y un 0,42 % a término (2).

En la década de los 80 nació el cribado para AC en el 2do T de gestación, este se realiza entre las 15 a 22+6 semanas de gestación (SG), con la dosificación en suero materno de la alfafetoproteína (AFP), la gonadotropina coriónica humana (hCG) o la subunidad libre  $\beta$  de la hCG ( $\beta$ -hCG), y el estriol no conjugado

(uE3) y se denomina triple prueba del 2do T (2, 11), con una TD de 60 % para una TFP de 5 % (4). La adición de un cuarto marcador, la inhibina A, constituyó la cuádruple prueba, con TD de 75 % para una TFP de 5 % (2, 4, 12).

A partir de la década de los 90 se utilizan marcadores bioquímicos de T21 del 1er T de gestación, tales como la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A), la inhibina A, la  $\beta$ -hCG (4, 13). Se realizan entre las semanas 9 a 13+6 de gestación (3).

La TD para la T21 en el 1er T es de 60 % con TFP de 5 %, cuando a la edad materna se le suma la PAPP-A y la  $\beta$ -hCG (4, 9, 14) y se denomina doble prueba bioquímica. La cuádruple prueba del 1er T, añadiendo a los anteriores la AFP y el uE3, conseguiría, según los modelos matemáticos, una capacidad de detección de T21 del 70 % para una TFP del 5 % o, una TFP de aproximadamente el 14 % para conseguir una TD del 85 % (2).

En la primera década de este siglo, se valora la utilización del antígeno trofoblástico invasivo (ITA) (2, 15, 16), y de la desintegrina A y la metaloproteasa 12 (ADAM 12), sola o combinada con otros marcadores, en el 1er T de la gestación (2, 4, 17). La edad materna, en combinación con las mediciones de PAPP-A, más ITA produce TD de 75 % y TFP de 8 % (15), o TD de 71 % para TFP: 5 % (16). Cuando a la edad materna se le suma la PAPP-A y la ADAM 12 a las 8-9 semanas la TD para la T21 es de 91 % con TFP de 5 % (17).

En 1985 se describió el pliegue nucal como marcador ecográfico para la T21 en el 2do T (18), el pliegue nucal engrosado  $\geq 6$  mm incrementa el riesgo de T21 (2, 19).

Se han identificado marcadores ecográficos blandos (anomalías menores) y anomalías estructurales mayores asociados a la presencia de un feto afecto de una AC. Los marcadores blandos son considerados

variaciones de la normalidad, la detección de múltiples marcadores blandos implica un aumento del riesgo de AC (20). Como marcadores blandos en el 2do T de T21 se destacan: pliegue nucal, acortamiento de los huesos largos (fémur y húmero), foco hiperecogénico intracardiaco, hiperecogenicidad intestinal, ectasia piélica, quistes de plexos coroideos y el hueso nasal (HN), clinodactilia, separación entre el primer y el segundo dedo del pie, braquicefalia, ventriculomegalia leve, megacisterna magna, ángulo ilíaco aumentado, arteria umbilical única y alteración del índice de pulsatilidad del conducto venoso (2).

La evaluación del riesgo de AC mediante la asociación de varios marcadores blandos y anomalías mayores por una evaluación ecográfica en 2do T se conoce como sonograma genético, y se realiza en gestaciones de alto riesgo de AC para reevaluación del riesgo (2, 20).

La ecografía transvaginal de alta resolución durante el 1er T facilita la detección temprana de anomalías estructurales mayores fetales (defectos cardíacos, atresia duodenal, onfalocele, holoprosencefalia, higroma quístico) y anomalías blandas asociadas a AC; además, permite establecer criterios ecográficos de sospecha de estas anomalías. Se realiza entre las 11 y 13+6 SG, estos hallazgos se utilizan para definir un grupo de gestantes de alto riesgo (2, 21).

En 1990, se describió, en el 1er T del embarazo, la presencia de líquido subcutáneo en la región nucal de un feto afectado de T21. Se denominó translucencia nucal (TN), es el marcador más temprano y sensible (22, 23).

En los fetos euploides, el grosor de la TN aumenta con la longitud céfalo-caudal fetal (LCC). La mediana y el percentil 95 de la TN para una LCC de 45 mm son de 1,2 y 2,1 mm y los respectivos valores para una LCC de 84 mm son de 1,9 y 2,7 mm. El percentil 99 no cambia significativamente con la LCC y es aproximadamente

3,5 mm. El aumento de la TN se define como un valor por encima del percentil 95 de acuerdo a la LCC. La prevalencia de AC, malformaciones estructurales y muerte fetal aumentan dependiendo de qué tan incrementada se encuentre la TN (2-4, 24, 25).

El cribado mediante TN y edad materna puede identificar el 75 % - 80 % de los fetos con T21 y otras trisomías con una TFP del 5 % (9). La combinación de la TN con alteración del índice de pulsatilidad del conducto venoso incrementa la TD de T21 al 85 %, aumentando al 92 % cuando se incorpora el cribado bioquímico temprano (2).

En 2001 se reportó la ausencia o hipoplasia del HN fetal por ecografía en el 73 % de fetos con T21 (26).

La combinación de PAPP-A,  $\beta$ -hCG libre y la TN, conocido como cribado combinado del 1er T (CCPT), se ha consolidado en el ámbito de la Medicina Privada como de la Medicina Pública en España ofrece TD de alrededor del 85-90 % para el 5 % de FP (2, 3, 5, 9).

Desde 1999, se realizan marcadores usados en el 1er y 2do T, bajo el nombre de prueba integrada (27), incluye la edad materna junto con la medición de TN y determinación de PAPP-A del 1er T, y de AFP, hCG, uE3 e inhibina A del 2do T; es un cribado secuencial en dos o tres pasos, ofreciendo hasta el 2do T el resultado de riesgo estimado en relación con la integración de todos los marcadores del mismo (2). Con TD de 94 % y de FP de 5 %, o de 85 % para 1 % de FP (4, 28, 29).

El cribado secuencial contingente, se basa en el nivel del riesgo indicado por el cribado del 1er T, se fijan dos niveles de corte (por ejemplo, 1:100 y 1:1000) que separan a las gestantes en tres grupos de riesgo. A las pacientes con alto riesgo se les ofrece prueba diagnóstica a través de técnica invasiva y a las pacientes con un riesgo intermedio se les valora la AFP, la  $\beta$ -hCG libre o la hCG, el uE3 y la inhibina A en

el 2do T y el riesgo de estas últimas se estima mediante la combinación de todos los marcadores, mientras que la de bajo riesgo no se les valora ningún otro marcador (2).

Existen alternativas tales como la realización de la prueba combinada de 1er T y en función del resultado obtenido se establecen distintas actuaciones. En riesgos superiores a 1/100 se ofrece una prueba diagnóstica, en riesgos inferiores a 1/1000 se considera negativa y en riesgos intermedios (entre 1/101 y 1/1000 se determinan marcadores ecográficos de segunda línea (HN, insuficiencia tricuspídea y alteración del índice de pulsatilidad del conducto venoso) de los cuales se ha estimado cociente de probabilidad positivo y negativo. Con esta estrategia se ha estimado más del 90 % de T21 con un índice de FP del 2-3 % (2, 30).

A partir de 2011, se ha incorporado el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) libre total circulante en el plasma materno (ADN-lc) para el cribado de las aneuploidías fetales (31-39). Esta prueba se basa en el análisis del ADN-lc, del que aproximadamente un 10 % es de origen placentario (3). La secuenciación de este ADN-lc mediante tecnologías avanzadas, ha producido una nueva tecnología de cribado prenatal denominada prueba prenatal no invasiva (PPNI) y ha aumentado la TD de T21 a más del 99 % y disminuyendo la TFP a menos del 0,1 % (1:1000 pacientes) (40).

El objetivo de esta revisión fue describir los fundamentos básicos de la prueba prenatal no invasiva mediante el ADN libre total circulante en el plasma materno para cribado de aneuploidías, y de los métodos primordiales y avances en biología molecular, incluyendo la tecnología de secuenciación de nueva generación, que lo han facilitado, considerando sus beneficios e inconvenientes al aplicarlas en la práctica clínica, en este campo que cambia con tanta rapidez.

En esta revisión narrativa de la literatura sobre el tema, se revisaron los primeros trabajos, libros de texto, y las

bases de datos Pubmed, Elsevier y publicaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos y de la Sociedad internacional de ultrasonido en obstetricia y ginecología entre septiembre 2022 y marzo 2023. Se incluyeron artículos hasta 2021 y se seleccionaron aquellos que los autores consideraron relevantes. Se incluyeron como palabras clave de búsqueda todas las combinaciones de ácido desoxirribonucleico fetal libre, cribado prenatal, aneuploidia, avances en biología molecular, secuenciación de nueva generación, asesoramiento genético y sus traducciones al inglés. Se describe el resultado del análisis bibliográfico.

## **ÁCIDOS NUCLEICOS Y AVANCES TECNOLÓGICOS DE GRAN IMPACTO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

El ácido nucleico está compuesto de un largo polímero de moléculas individuales denominados nucleótidos. Cada nucleótido se compone de una base nitrogenada, una molécula de azúcar de cinco carbonos y una molécula de fosfato. La base nitrogenada puede ser de dos tipos, purina y pirimidina. Las purinas son adenina (A) y guanina (G); las pirimidinas son citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Hay dos tipos de ácido nucleico, el ácido ribonucleico (ARN), que contiene el azúcar ribosa, y el ácido desoxirribonucleico (ADN), que contiene el azúcar desoxirribosa. Tanto el ADN como el ARN contienen las bases A, G y C, pero la T solo se encuentra en el ADN y el U en el ARN (7).

El genoma humano consiste en un código de 3000 millones de letras, se compone de ADN, que contiene en su estructura la información genética necesaria para especificar todos los aspectos de la embriogénesis, el desarrollo, el crecimiento, el metabolismo y la reproducción, que hacen que un ser humano sea un organismo funcional. El genoma humano, posee alrededor de 25 000 genes codificantes de proteínas y 25 000 genes cuyo producto es ARN funcional y están codificados

en el ADN, que se estructura en los cromosomas, que se localizan en el núcleo de cada célula. La naturaleza específica de la información genética codificada en el genoma humano se corresponde a la secuencia de las bases C, G, A y T existentes en las dos cadenas que se disponen en cada uno de los cromosomas (1).

En 1953, Watson y Crick, sugirieron que la molécula de ADN estaba compuesta por dos cadenas de nucleótidos dispuestas en una doble hélice. El esqueleto de cada cadena está formado por puentes fosfodiésteres entre los carbonos 3' y 5' de los azúcares adyacentes, y las dos cadenas se mantienen juntas por puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, que apuntan hacia el centro de la hélice. Cada cadena de ADN tiene una polaridad determinada por la orientación del esqueleto de azúcar-fosfato. El final de la cadena lo constituye el átomo de carbono 5' de la molécula de azúcar y se denomina el extremo 5', mientras que el final representado por el átomo de carbono 3' se denomina el extremo 3'. En la doble hélice, el extremo 5' de una hebra se opone al extremo 3' de la otra. Una purina en una cadena siempre se empareja con una pirimidina en la otra cadena, con un apareamiento específico de los pares de bases (pb): la G de una cadena siempre se empareja con la C de la otra cadena, mientras que la A lo hace siempre con la T, de forma que estos pb forman hebras complementarias. Por su trabajo, Watson y Crick, junto con Maurice Wilkins, fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1962, con lo que se inauguró la era de la genética molecular (7, 41).

En 1966 se había dilucidado la estructura química del ADN y el sistema por el cual esta determina la secuencia de aminoácidos de las proteínas (41). En 1968, Robert Holley, Gobind Khorana y Marshall Nirenberg recibieron el premio Nobel por el desciframiento del código genético (7).

Rodríguez y cols. (42) citan que el progreso de la biología molecular ha sucedido con grandes cambios. Una época nutrida de dichos cambios fue la década de 1970, en la que se produjo un gran número de descubrimientos, como

el de las endonucleasas o enzimas de restricción (grupo de enzimas cada una de las cuales reconoce secuencias de doble cadena específicas en el ADN, las corta a nivel de los elementos fosfodiéster en el lugar de reconocimiento o cerca de este, y produce, de esta forma, fragmentos de ADN de diferentes tamaños), por este descubrimiento en 1978, Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith recibieron el premio nobel (1, 7); la clonación de genes en plásmidos y fagos, y las técnicas de hibridación en filtro para ADN y ARN, conocidas como *Southern* y *Northern blot*, respectivamente; así como las técnicas de secuenciación para el ADN (42).

Con el método Sanger de secuenciación, en 1977, los laboratorios pudieron disponer de un método fiable y reproducible para el análisis de secuencias de ADN (conocer, el orden de los nucleótidos en un segmento de ADN o ARN) (43). Fred Sanger y Walter Gilbert recibieron el premio nobel en 1980 por desarrollar la secuenciación de ADN (1).

El método de secuenciación de ácidos nucleicos diseñado por Sanger (método de terminadores dideoxi) (44), que usa los cuatro nucleótidos modificados con la ausencia del extremo 3'OH, grupo esencial para la polimerización por la ADNpolimerasa, conocidos como dideoxi nucleótidos (ddA, ddC, ddG y ddT), es uno de los más utilizado. En la secuenciación Sanger, un fragmento de ADN que va a ser secuenciado se usa como plantilla para la síntesis de ADN cebado por un nucleótido corto, y la ADNpolimerasa sigue la secuencia de la plantilla, ampliando el cebador e incorporando nucleótidos. Para obtener información de la secuencia, en primer lugar, se añaden a las reacciones de secuenciación análogos dideoxi (cada análogo se marca con un colorante fluorescente diferente que presenta su propia emisión lumínica distintiva) junto con los cuatro nucleótidos normales. La polimerasa incorpora un nucleótido normal, de manera que sigue extendiendo la cadena, o bien una base dideoxi, lo que interrumpe la síntesis. Las cadenas finalizadas son separadas mediante electroforesis capilar y el nucleótido dideoxi concreto que fue responsable de la terminación es identificado a través de la molécula concreta del colorante fluorescente

que es incorporada, y se puede determinar el orden de los nucleótidos. Se han diseñado máquinas para automatizar el procedimiento de la secuenciación de ADN (1).

Otro salto tecnológico ocurrió en 1983, cuando se desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN in vitro: la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (45). La técnica de RCP emplea un par de oligonucleótidos (cebadores) para delimitar una región de interés y una polimerasa para extenderlos, utilizando ambas hebras del gen en cuestión como plantilla. Al repetir este ciclo decenas de veces, se duplica cada vez el fragmento de ADN en cuestión. Así se logra copiar millones de veces la secuencia de interés, aunque se encuentre entre millones de otras secuencias de ADN (42). Se utilizan termocicladores o máquinas de RCP diseñadas al efecto, una ronda de amplificación requiere solo unos minutos. De este modo, en pocas horas pueden crearse muchos billones de copias de una molécula de ADN (1). Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX, se cataloga como la estrella de las herramientas de la biología molecular. Debido a esto, Kary Mullis se hizo acreedor, en 1993, del premio nobel en química (42).

La técnica de RCP ha evolucionado, dando lugar al desarrollo de la RCP cuantitativa (RCPc), utilizada desde 1996 (46). Esta técnica permite la monitorización, en tiempo real, del proceso de amplificación y la detección de los productos de RCP a medida que se elaboran. Los termocicladores de RCPc han reducido el tiempo para generar productos de RCP, en lugar de horas de la RCP convencional a menos de una hora, y se utiliza la tecnología de fluorescencia para controlar la generación de productos de la RCP durante cada ciclo (monitorean la señal fluorescente a medida que ocurre la amplificación), con referencia a estándares que contienen números de copias conocidos, eliminando de esta forma utilizar la electroforesis en gel (7).

En la RCP digital (RCPd), utilizada desde 1999 (47), la solución de RCP se divide en decenas de miles de gotas

de tamaño nanométrico y se produce una reacción de RCP separada en cada una. Se pueden usar diferentes métodos para dividir muestras, incluidas placas de micropocillos, capilares, emulsión de aceite y matrices de cámaras miniaturizadas con superficies de unión de ácido nucleico (48). Luego, cada producto se analiza por separado utilizando sondas fluorescentes. Se analiza cada gota con estadísticas de Poisson para determinar el porcentaje de gotas de RCP positivas en la muestra original, las particiones se clasifican como positivas diana detectada o negativa objetivo no detectado, que proporciona la base para un formato de salida digital (47).

A comienzos del siglo XXI, el proyecto genoma humano proporcionó una secuencia casi completa del ADN humano, el borrador de la secuencia de ADN se completó con éxito en el año 2000 y la secuencia completa se publicó en el 2004 (7), que ahora sirve como base para catalogar a todos los genes humanos. Estos avances hacen posible la medicina genómica, que persigue la aplicación a gran escala del análisis del genoma humano y sus productos (incluyendo el control de la expresión genética, la variación de los genes humanos y las interacciones entre los genes y el ambiente) en la asistencia médica (1).

En 2005, aparecieron nuevos métodos de secuenciación y analizadores capaces de multiplicar la cantidad de datos obtenidos, pasando de 84 kilobase/ensayo a 1 gigabase/ensayo. Es el nacimiento de lo que se conoce como secuenciación de nueva generación (SNG) (49, 50). Esta nueva tecnología ha permitido la lectura de millones de secuencias de forma masiva y paralela (SMP) en un menor lapso y a un menor costo por base, su evolución ha sido constante, desde la aparición de las primeras plataformas de SNG, con incrementos de capacidad de generación de datos de más del doble cada año; facilitando el diagnóstico de enfermedades de alta heterogeneidad genética y su aplicación en la práctica clínica (51-53). El elevado número de datos obtenidos implica una gran complejidad en el manejo y almacenamiento de los mismos y ha ido acompañado del desarrollo de herramientas bioinformáticas para su análisis (54).

En 2008, se describió, por primera vez, el uso de la SMP para el análisis del ADN-Ic, ya que además de la secuenciación, permite la cuantificación de los fragmentos de ADN de todo el genoma presentes en la muestra. Mediante SMP es posible obtener millones de fragmentos de ADN, tanto fetales como maternos, que pueden ser asignados al cromosoma del cual provienen gracias a la disponibilidad de la secuencia completa del genoma humano (55, 56).

La secuenciación bidireccional permite secuenciar los dos extremos de los fragmentos de ADN y alinear las lecturas hacia adelante y hacia atrás como par de lecturas. Así se obtienen el doble de lecturas para la misma genoteca o librería en un único ensayo. Los algoritmos de alineamiento utilizan esta información para alinear de forma más precisa lecturas que quedan en regiones repetitivas, difíciles de secuenciar, incrementando así el número de secuencias útiles para la cuantificación. Después del alineamiento frente a la secuencia del genoma de referencia y la determinación de su localización, se pueden identificar la distancia entre los extremos y el tamaño de todos los fragmentos de ADN (57).

Los nuevos métodos de secuenciación se han alejado de la metodología de Sanger y se han movido hacia la secuenciación por síntesis catalizada por la ADN polimerasa. Si a la molécula de ADN a secuenciar se le agregan, mediante pasos de ligación y RCP, nucleótidos de secuencia conocida en sus extremos para que se adsorba por hibridación a una superficie, las bases incorporadas al ADN se pueden detectar de manera directa, durante su síntesis, mediante marcado fluorescente diferencial de los cuatro posibles nucleótidos del ADN (58).

También se puede detectar la incorporación de las bases de manera indirecta midiendo los cambios de pH ocasionados por la producción de protones durante la polimerización o midiendo la concentración del pirofosfato producido durante la polimerización (49, 59). Así, llevando a cabo estas reacciones sobre plataformas nanométricas, se pueden secuenciar simultáneamente

decenas de millones de fragmentos cortos de 37-200 bases, dependiendo del método. La secuenciación por síntesis permite la resecuenciación de genomas, haciendo realidad la medicina genómica personalizada donde se pueden buscar marcadores o descubrir alelos responsables de enfermedades genéticas en individuos (60).

La tecnología de SNG incluye varios métodos que se agrupan en un esquema de trabajo que consta de los siguientes pasos: 1) Preparación del ADN para la secuenciación (construcción de una genoteca de ADN, a partir de la muestra a analizar); implica la fragmentación del ADN y la incorporación de adaptadores para su adhesión en la plataforma de secuenciación, y la amplificación de los fragmentos de ADN por métodos basados en RCP; 2) secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN, y 3) reconstrucción de la secuencia completa por medio de secuencias de referencia y exportación a ficheros de almacenamiento de datos (61, 62).

#### **ADN LIBRE FETAL CIRCULANTE EN SANGRE MATERNA**

Martínez y cols. (63), en 2001, describieron que se ha experimentado un creciente interés por desarrollar técnicas no invasivas para obtener células fetales. Las primeras técnicas de separación y enriquecimiento de células fetales en sangre materna se utilizaron en los años 70. Fundamentalmente, hay tres tipos de células fetales en la circulación materna: trofoblásticas, linfocitos y eritroblastos.

La placenta constituye el punto de máxima proximidad entre la circulación sanguínea fetal y la materna y permite el intercambio de sustancias en ambos sentidos. Pero, además del intercambio de nutrientes entre madre y feto, se ha descubierto que existe un intercambio celular durante el embarazo (64). La detección de células de origen fetal en sangre periférica materna (mayoritariamente eritroblastos nucleados) (65) y el aislamiento de células fetales del canal endocervical (66),

han permitido la identificación no invasiva de anomalías en el feto. Sin embargo, existen grandes dificultades como el escaso número de células presentes (1 célula/mL de sangre aproximadamente) y la dificultad tecnológica que implica su aislamiento y enriquecimiento (67).

Se ha demostrado la presencia de secuencias de ADN de feto masculino en sangre de mujeres embarazadas en cantidades significativamente más elevadas que las que se pueden obtener a partir de células fetales aisladas (68), y también que la concentración de ADN libre fetal (ADN-If) es similar en plasma y suero materno, pero en suero es más grande el contenido de ADN materno presente, causando una detección menos eficiente del ADN-If; por esta razón, se prefiere el plasma materno como fuente de ADN-If (61,69).

El ADN-If coexiste con el ADN libre materno (procedente de procesos apoptóticos de diferente origen celular). Puede ser detectado desde la 4a semana de gestación (70).

Los procesos de apoptosis en la placenta, que también se dan en gestaciones normales, y que, al igual que las concentraciones de ADN-If, aumentan con las semanas de gestación, señalan a la placenta como principal fuente de origen de este ADN, con un papel mínimo adicional de las células hematopoyéticas y la transferencia directa (71-74).

La concentración total de ADN-If, alcanza una media de 25,4 equivalentes genómicos/ml (rango 3,3-69,4) en el embarazo temprano y 292,2 equivalentes genómicos/ml (rango 76,9-769) al final del embarazo, siendo el genoma equivalente definido como la cantidad de una secuencia de ADN presente en una célula diploide (69). El porcentaje de ADN-If representa una fracción de 3 % a 13 % del total de ADN libre en sangre materna en el primer y segundo trimestre, la mediana de la fracción fetal obtenida entre 10 y 14 semanas de embarazo es de alrededor del 10 % (75). Se ha reportado que, entre la semana 10 y 21 de gestación, aumenta en 0,1 % por semana y luego de la semana 21, aumenta 1 % por semana (76). Pocas horas

después del parto es indetectable ya que es rápidamente eliminado por la orina (77).

Se ha demostrado que la distribución por tamaño de los fragmentos de ADN-If circulante en plasma es diferente a la de los maternos, siendo los menores de 150 pb mayoritariamente de origen fetal (78). Esta diferencia de tamaño permite hacer una estimación de la proporción de ADN-If en la muestra (39).

Se han publicado varios marcadores con diferencias en cuanto a patrones de metilación entre el ADN fetal y el materno. Comparar la relativa representación de los haplotipos fetales y maternos puede usarse para calcular la fracción fetal (FF). Se ha demostrado la posibilidad de detección del gen inhibidor de la serina proteasa, miembro 5 de la familia B (*SERPIN5*), hipometilado en la placenta, pero hipermetilado en ADN materno; la localización de este gen en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) permite una aproximación diagnóstica de aneuploidías debidas a sobreexpresión de este cromosoma. Posteriormente, se han descrito otros marcadores fetales epigenéticos como el gen de la proteína 1 de la familia del dominio de asociación RAS (*RASSF1A*), presente en el brazo corto del cromosoma 3 (3p) y numerosos marcadores existentes en el cromosoma 21 (79-83).

La FF varía entre individuos y puede verse alterada debido a diversos factores biológicos, disminuye al aumentar el peso materno o índice de masa corporal por un efecto dilucional producido por el mayor volumen plasmático y debido a que el recambio de adipocitos aumenta el porcentaje de ADN materno circulante, con la edad materna avanzada, en presencia de algunas aneuploidías fetales como la trisomía 13 y 18. Respecto al grupo étnico, se ha detectado menor FF en mujeres de origen afrocaribeño y del sur de Asia en comparación con las caucásicas, en embarazos obtenidos por técnicas de reproducción asistida, y el uso de heparina de bajo peso molecular (75, 76, 84-88). En presencia de patologías placentarias se incrementa (89).

La FF también puede verse alterada por factores relativos al procesamiento de la muestra, tales como factores preanalíticos, como la lisis de las células sanguíneas maternas que se produce en el periodo comprendido entre la extracción y la separación del plasma previa a la extracción del ADN e implica una reducción de la FF, el anticoagulante utilizado, el volumen total de sangre periférica, las condiciones de transporte de las muestras, la temperatura de almacenamiento y el tratamiento posterior que se hace de este (por ejemplo doble o simple centrifugación, tratamientos con formaldehído) (84, 85, 90).

### PRUEBA PRENATAL NO INVASIVA

La mayoría de los ensayos desarrollados utilizan la secuenciación completa del genoma (evalúa todas las bases del genoma, incluyendo las regiones no codificantes) (31, 32, 55, 56) y la secuenciación de regiones específicas del genoma, donde se secuencian las regiones de los cromosomas más frecuentes asociados a las aneuploidías fetales (21, 18, 13, X, Y) (34-36).

También se utilizan metodologías, que incluyen información genómica, a través de polimorfismos de nucleótido único de los cromosomas más frecuentes asociados a aneuploidías, permitiendo la identificación de regiones específicas fetales o maternas en las lecturas realizadas, analizando las diferencias de polimorfismo entre el feto y la madre, mediante la comparación del ADN de la fase celular (ADN materno) y del plasma (materno y fetal). Previamente a la secuenciación, se realiza una RCP múltiple de 20 000 secuencias de polimorfismos de nucleótido único y posterior análisis bioinformático con base en las hipótesis de feto con trisomía, monosomía o euploide. En función de la posición de los polimorfismos de nucleótido único, y teniendo en cuenta la posibilidad de recombinación, se obtiene un valor estadístico de índice de probabilidad que establece un riesgo relativo de aneuploidía (91).

Las distintas metodologías se basan en la detección de un aumento de un 50 % de un determinado cromosoma en la pequeña proporción del ADN-If mezclado con el materno (92). Es decir, en presencia de una trisomía fetal, se detecta un incremento en la cantidad relativa de lecturas de ADN alineadas en el cromosoma implicado respecto a lo esperado en un feto euploide para dicho cromosoma. Las diferencias en el número de lecturas obtenidas que deban ser detectadas son muy pequeñas pero significativas, respecto al número de secuencias correspondientes a un cromosoma de referencia (1).

Las tecnologías de secuenciación más utilizadas son los métodos de secuenciación *Illumina* e *Ion Torrent*. La secuenciación por medio de *Illumina* se lleva a cabo en una superficie sólida de vidrio separada por carriles, se caracteriza básicamente por la amplificación de los fragmentos de ADN para la generación de colonias del mismo fragmento mediante el método de RCP en puente y la detección de bases en la secuenciación se hace a través de etiquetas fluorescentes (93-95).

La exactitud de la secuenciación en el secuenciador *Illumina* será determinada por la intensidad de la señal, y la longitud de las lecturas, por el número de ciclos realizados. Actualmente, alcanzan una longitud por lectura de hasta 300 pb (96).

La secuenciación por medio del secuenciador *Ion Torrent* se lleva a cabo en un circuito integrado semiconductor, y se caracteriza por la amplificación de los fragmentos de ADN utilizando la técnica de RCP en emulsión y la detección de las bases en la secuenciación se da por medio de la detección de un ion semiconductor (94, 97). Este método de secuenciación se basa en la detección del cambio de voltaje por medio de un sensor o transistor de efecto de campo sensible a los iones, que indica que el nucleótido se ha incorporado correctamente (98). Este proceso alcanza una longitud de lectura de hasta 400 pb (94, 97).

## CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO LIBRE TOTAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO. REVISIÓN NARRATIVA

Para el análisis se han usado diferentes abordajes, puede realizarse mediante la normalización del número de lecturas obtenidas para el cromosoma de interés respecto a otros cromosomas de referencia, de contenido en GC comparable y esperados disómicos, que son analizados en el mismo ensayo (56, 99), o bien, mediante la comparación con un grupo de casos euploides conocidos (31). También, mediante un valor Z-Score que expresa el valor de desviación del resultado obtenido en el cromosoma de interés respecto a la situación euploide (32, 55). Las muestras se clasifican como positivas para T21 si en los valores de Z-Score superan un valor límite preestablecido sobre la base de los casos euploides (32).

Otro abordaje se basa en el análisis mediante *t-Students* de dos hipótesis: y el resultado se deba a la presencia de un feto euploide o que sea consecuencia de la presencia de un feto aneuploide y así calcular un valor estadístico o índice de probabilidad (100).

Varias compañías han comercializado la PPNI en todo el mundo, generalmente se toman muestras localmente y las envían a laboratorios para su procesamiento (101).

Se encuentran disponibles PPNI de diferentes casas comerciales que ofrecen la detección de aneuploidías de los cromosomas 13,18,21, y aneuploidias cromosómicas sexuales y adicional la detección de otras alteraciones como aneuploidía en los cromosomas 22, 16, 9; microdeleciones [síndrome de deleción 1p36, 4p- o síndrome de Wolf-Hirschhorn, 5p- o síndrome de Cri-du-chat, 8q24.1 síndrome de Langer-Giedion, 11q23 síndrome de Jacobsen, 15q11 (asociada a los síndromes de Prader-Willi y Angelman) y 22q11.2 o síndrome de Di George], y microduplicaciones (61,101-103). La cobertura de aneuploidías cromosómicas sexuales, otras AC y sexo fetal varía según la compañía y el país (101).

Por recomendaciones internacionales la PPNI debe

ser realizada a partir de la semana 10, pero no existe un límite superior. El tiempo promedio para entrega del resultado está entre 4 a 10 días (dependiendo del laboratorio y de las enfermedades que se detecten en una muestra) y el resultado se expresa como positivo o negativo o sospecha de aneuploidía o ausencia de aneuploidía o como riesgo alto > 99 % o riesgo bajo menor a 1/10 000 (3,101,104).

Se necesita una FF mínima del 4 % para emitir un resultado fiable. Para interpretar la PPNI desde un punto de vista clínico, se recomienda que todos los laboratorios incluyan en el informe emitido con los resultados la FF hallada, la técnica de análisis empleada, la TFP y TFN para esa técnica, TD y el VPP para la trisomía cribada (3,105-107).

En cuanto a la forma de aplicación de la PPNI en el ámbito clínico, se realiza como cribado primario. El costo de esta prueba hace que, cualquier estrategia basada en él como primera línea, suponga una derivación de recursos sanitarios difícilmente justificable, especialmente en sectores poblacionales con un riesgo *a priori* bajo (3).

Como cribado secundario o modelo contingente, se utiliza el CCPT como prueba de primera línea para detectar a las pacientes de alto riesgo o riesgo intermedio y ofrecer la posibilidad de realizar la PPNI frente a la prueba diagnóstica de AC. Se espera que este sistema incremente la TD y reduzca los FP sin el incremento del costo que representaría aplicar el cribado mediante la PPNI a todas las pacientes (21, 40,108).

El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos y la Sociedad de Medicina Materno-Fetal recomiendan que las opciones de cribado genético y pruebas de diagnóstico prenatal se deben ofrecer a todas las mujeres embarazadas, independiente de la edad materna o riesgo de AC, y cada paciente tiene el derecho de continuar o rechazarlas (19).

## BENEFICIOS DE LA PPNI

La PPNI es una prueba segura y rápida, se necesita una muestra de sangre de la madre, el rendimiento para el cribado de aneuploidía es alto y mejor que los enfoques de detección prenatal convencional (1,19).

Ha demostrado tener una alta sensibilidad tanto en pacientes de alto como de bajo riesgo. Casi el 90 % de las gestantes en las que se indica que el bebé podría tener una anomalía obtendrían con esta técnica un resultado más cercano a la realidad de la situación de su bebé (109-111). Los metaanálisis han reportado que la sensibilidad para T21 osciló entre 99,0 %, 93,0 % y 99,7 %; para T18 osciló entre 96,8 %, 97,4 % y 97,9 %; y para T13 osciló entre 92,1 %, 95,8 % y 97,4 % (40, 112, 113).

Estudios publicados en población española confirman la reducción en el uso de técnicas invasivas en población de riesgo alto, intermedio, y bajo (114).

## LIMITACIONES DE LA PPNI

Se requiere una FF adecuada y técnicas altamente específicas y eficientes para su detección y purificación, lo cual conlleva que sea de alto costo (61). Tiene su capacidad diagnóstica limitada. No detecta cualquier anomalía genética, sino solo aquellas para las que se ha diseñado la prueba. A las pacientes con un resultado negativo en la prueba se les debe informar que este reduce sustancialmente el riesgo de aneuploidía objetivo, pero no garantiza que el feto no se vea afectado, además de la posibilidad de verse afectado por trastornos genéticos que no son evaluados por la prueba (19).

El modelo de aplicación de esta prueba en la práctica clínica habitual dentro de los programas de salud constituye todavía un punto de controversia y es un método de cribado de AC, por lo que siempre debe ser confirmada posteriormente por prueba diagnóstica

(113), y como ocurre con cualquier método de cribado, existe la posibilidad de que esta no sea capaz de proporcionar un resultado, y tiene tasa de FP y tasa de FN (19).

Las tasas de fallo para trisomías 21, 13 y 18 varían entre el 1 % y el 5 %, dependiendo del laboratorio y de la metodología utilizada. Para cromosomas sexuales es más alta, varía entre el 4 %, 5,9 %, y el 7 % (115,116). Las tasas publicadas de resultados no concluyentes son mayores para las plataformas basadas en polimorfismos de nucleótido único y es del 6,39 % (118), en las plataformas que usan secuenciación masiva del genoma completo, es de 1,58 % y en la de cromosomas específicos de 3,56 % (113,117). Esto puede ocurrir por problemas con la recolección y transporte de la muestra, tales como volumen inadecuado, hemólisis o errores en la identificación; fallas en el procesamiento de la muestra durante la extracción, amplificación, secuenciación del ADN, análisis del mismo, y FF baja, generalmente inferior a 4 % (40).

Esto crea un dilema clínico ya que un resultado no concluyente se asocia con una mayor probabilidad de aneuploidía fetal u otros posibles resultados adversos (118,119). Las vías de manejo sugeridas después de un resultado no concluyentes incluyen repetición de la extracción de sangre para el análisis de PPNI, pruebas de diagnóstico o una forma alternativa de detección de aneuploidías, como el CCPT (19,120).

Otra razón para que esta prueba falle, son los tramos largos de homocigosidad, (regiones en las que las secuencias génicas son idénticas en los 2 cromosomas del par), como en el caso de la disomía uniparental y en la consanguinidad parental (121). El porcentaje de muestras sin resultado tras repetir una vez la prueba es globalmente del 1 % - 2 %. (113).

En la interpretación de los resultados FP en los cuales la prueba es informada con presencia de anomalías

## *CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO LIBRE TOTAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO. REVISIÓN NARRATIVA*

en fetos sin afectación, se debe tener en cuenta que la mayoría de FP son analíticamente correctos (realmente hay un aumento de material genético correspondiente a ese cromosoma) pero clínicamente incorrectos (ese aumento de material genético no procede del feto). Las causas más frecuentes de FP son: el feto evanescente en gestación inicialmente gemelar, la contribución de ADN en plasma de un feto no evolutivo puede generar resultados discordantes, debido a que ambos contribuyen a la FF (122).

En el mosaicismo confinado a la placenta (coexistencia de dos líneas celulares diferentes en la placenta: una euploide y otra aneuploide), dado que la fuente principal de ADN libre en la circulación materna procede de la placenta, la PPNI proporcionará resultados relativos a la placenta, que pueden ser discordantes con el tejido fetal. La experiencia adquirida mediante biopsia de vellosidades coriales indica que esto puede ocurrir en 1 % - 2 % de los embarazos (123,124).

El cromosoma X, en particular, es el que más contribuye al índice de FP debido a la pérdida relacionada con la edad materna, una proporción cada vez mayor presenta un pequeño porcentaje de células que han perdido un cromosoma X, a la presencia de un mosaicismo materno no diagnosticado como por ejemplo 45,X/46,XX. En estas mujeres, fenotípicamente normales, la pérdida de una porción de la señal del cromosoma X se atribuiría al feto siendo informadas como monosomía X fetal, algunas mujeres pueden tener una aneuploidía de los cromosomas sexuales 47,XXX, desconocida en el 90 % de los casos (125,126).

La aparición de más de una aneuploidía al mismo tiempo, ganancias y pérdidas subcromosómicas en múltiples cromosomas, puede sugerir una neoplasia maligna oculta materna, en la que el ADN tumoral se disemina hacia la circulación materna (127-129).

La metodología de la PPNI supone que cada mujer porta la misma proporción de material genético en un

cromosoma en concreto, pero los cromosomas varían ligeramente entre individuos debido a variantes de número de copias (heredadas o de novo). En estos individuos, la PPNI podría reportar un resultado positivo cuando el tamaño de la duplicación materna es relativamente grande y ocurre en un cromosoma de interés (por ejemplo, el cromosoma 18) (115,116).

Si la madre es receptora de trasplante obtenido de un donante masculino, la PPNI puede identificar incorrectamente a un feto femenino como masculino. Si ha recibido una transfusión de un donante masculino antes de 4 semanas desde la obtención de la muestra de sangre, se puede identificar incorrectamente un feto femenino como masculino (124,127).

Los resultados FP también pueden ser fruto de la probabilidad estadística, ya que el límite para una prueba positiva a menudo se establece en +3 desviaciones estándar. Por lo tanto, 1 o 2 por cada 1000 fetos euploides podrían tener un resultado FP solo por casualidad (116).

En la interpretación de los resultados FN, en los cuales la prueba es informada con un resultado que indica que no existe ninguna AC y el feto está afectado, se debe tener en cuenta las siguientes causas:

En el mosaicismo confinado a la placenta el ADN producto de la apoptosis de las células placentarias puede ser discordante con el tejido fetal, con lo cual es posible que un feto sea aneuploide, pero la placenta no refleje ese hallazgo. En estos casos, la PPNI detecta las células placentarias del mosaicismo que son euploides aunque el feto es aneuploide (130).

La FF límite da como resultado una diferencia muy pequeña en el porcentaje esperado (referencia normal) versus el porcentaje observado de fragmentos de cromosomas. Si no se secuencian una cantidad suficiente de fragmentos, esta diferencia no se identifica y los resultados se informan incorrectamente como negativos (106).

En la PPNI con detección de microdeleciones y microduplicaciones y debido al número limitado de trastornos incluidos en la prueba, pueden dar FN como es el caso del síndrome Prader-Willi, que representa solo el 65 % - 75 % de los casos con deleción cromosómica, mientras que el resto son causados por disomía uniparental o un solo gen afectado; o en el caso del síndrome de deleción 22q11.2, en el cual el 85 % tiene una deleción de 3 Mb en el cromosoma 22, pero existen deleciones atípicas las cuales no serían detectadas por la PPNI (131).

Las mezclas de muestras u otros errores técnicos pueden dar lugar a resultados FP o FN, pero, es probable que estos se identifiquen como parte de las pruebas de seguimiento (106,132). La probabilidad estimada de FN de la PPNI varía entre 0,02 % y 0,26 % (133).

El Colegio Americano de Genética Médica y Genómica, publicó una guía de recomendaciones para llevar a cabo la PPNI. Incluye recomendaciones para los laboratorios que ofrecen PPNI, para que los pacientes reciban información precisa y actualizada y que los profesionales médicos dispongan de herramientas adecuadas y reciban informes de laboratorio claros para proporcionar asesoramiento genético (AG), en las primeras etapas del embarazo, para optimizar la toma de decisiones por parte de los pacientes y la colaboración de los laboratorios con oficinas públicas de salud, agencias reguladoras y fondos privados, para hacer que estas pruebas así como el AG previo y posterior estén al alcance de todas las mujeres embarazadas. La mayoría de los centros médicos académicos y las clínicas especializadas de medicina materno-fetal en los EE. UU, proporcionan ambos (101,134).

El AG debe ser realizado de manera clara, objetiva y no directiva, permitiendo a los pacientes tiempo suficiente para comprender y tomar decisiones informadas sobre las pruebas (1, 135).

El AG precribado, debe realizarse preferiblemente

entre las 10-12 SG (3), debe incluir una breve descripción de posibles pruebas de cribado, el rendimiento y el marco de tiempo para el retorno de los resultados, explicar al paciente en qué consisten, sus beneficios y limitaciones, que su realización es voluntaria, se describen las AC a estudiar, que es una prueba de cribado y si resulta positiva ha de ser confirmada con prueba genética diagnóstica y llevar a cabo un proceso de consentimiento informado (135, 136).

En el AG poscribado, los progenitores deben ser informados de forma oral y escrita. El informe que reciba el paciente debe ser claro, junto con una explicación por parte del profesional a cargo sobre la implicación de este resultado (137). Esto se realiza a través de una atención personalizada que se adecúe a la condición de cada paciente, posibles procedimientos que pudieran derivar del resultado, todas las opciones diagnósticas con los beneficios, riesgos y limitaciones de cada una de ellas y las posibilidades tras el diagnóstico, la descripción clínica, pronóstico fetal, las posibles decisiones terapéuticas, riesgo de recurrencia y, en caso necesario, de la necesidad de estudios familiares. Según sea el caso, indicaciones a seguir en futuro embarazo. Se notifica de las opciones reproductivas de estas parejas, nuevo embarazo sin o con técnicas de reproducción asistida, tales como diagnóstico genético preimplantacional, donación de gametos o embriones, adopción (3, 135).

**Sin conflictos de interés.**

## REFERENCIAS

1. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genética en medicina de Thompson & Thompson. 7a ed. España: Elsevier Masson Editores; 2016 [consultado septiembre de 2022]. Disponible en: <https://telemedicinadetampico.wordpress.com/wp-content/uploads/2011/11/libro-de-genetica.pdf>
2. Carrera J. Ecografía en diagnóstico prenatal. Colección de medicina materno-fetal. 1a. edición. Editorial Elsevier Masson. España. Editores. Carrera J. Kurjak A. 2008.

*CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO LIBRE TOTAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO. REVISIÓN NARRATIVA*

3. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Cribado y diagnóstico precoz de anomalías genéticas. *Prog Obstet Ginecol* [Internet] 2018 [consultado septiembre de 2022]; 61 (6):605-29. Disponible en: <https://sego.es/documentos/progresos/v61-2018/n6/GAP-CRIBADO-%20250918.pdf>
4. Gallo M, Gallo F, Ruote M, Fabre M, Espinosa A, *et al.* Cribado de la patología fetal. En Gallo M, editor. *Conceptos fundamentales. Colección de Medicina fetal y perinatal.* España: Amolca. 2011; 25-50.
5. Nicolaides K. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011;31(1):7-15. DOI: 10.1002/pd.2637.
6. Resta R. Historical aspects of genetic counseling: Why was maternal age 35 chosen as the cut-off for offering amniocentesis? *Med Secoli* [Internet]. 2002 [consultado 25 de octubre de 2022]; 14(3):793-811. Disponible en: [https://rosa.uniroma1.it/rosa01/medicina\\_nei\\_secoli/article/view/974/895](https://rosa.uniroma1.it/rosa01/medicina_nei_secoli/article/view/974/895).
7. Turnpenny P, Ellard S. *Elementos de Genética Médica de Emery.* 13a. edición. España: Editorial Elsevier, S. L. 2009.
8. Morales-Machín A, Urdaneta K, Borjas L, Méndez K, Machín E, Bracho A. Factores de riesgo genético y diagnóstico prenatal. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2021; 81(3): 209-225. DOI: 10.51288/00810305
9. Nicolaides K. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(1):45-67. DOI: 10.1016/j.ajog.2004.03.090.
10. Morris J, Wald N, Watt H. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.* 1999; 19(2): 142-5. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0223(199902)19:2<142::AID-PD486>3.0.CO;2-7
11. Alvarez-Nava F, Soto Marisol, Morales-Machín A, Rojas A, Urdaneta K, Cañizalez J. Prospective prenatal serum screening for Down syndrome in Venezuela. *IJGO.* 2008; 441-45. DOI:10.1016/j.ijgo.2008.07.017.
12. Wald N, Huttly W, Hackshaw A. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet.* 2003; 361(9360):835-6. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12680-3.
13. Brambati B, Macintosh MC, Teisner B. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A in the first trimester in association with abnormal karyotype. *Br Obstet Gynaecol.* 1993; 100(4):324-6. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1993.tb12973.x.
14. Haddow J, Palomaki G, Knight G, Williams J, Miller W, *et al.* Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N Engl J Med.* 1998; 338(14):955-61. DOI: 10.1056/NEJM199804023381404
15. Palomaki G, Knight G, Neveux L, Pandian R, Haddow J. Maternal serum invasive trophoblast antigen and first trimester Down syndrome screening. *Clin Chem.* 2005; 51(8):1499-504. DOI: 10.1373/clinchem.2005.050567.
16. Weinans M, Sancken U, Pandian R, Van de Ouweland J, De Bruijn H, Holm J, *et al.* Invasive trophoblast antigen (hyperglycosylated human chorionic gonadotropin) as a first-trimester serum marker for Down syndrome. *Clin Chem.* 2005; 51(7):1276-9. DOI: 10.1373/clinchem.2005.048751.
17. Laigaard J, Spencer K, Christiansen M, Cowans N, Larsen S, Pedersen B, *et al.* ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2006; 26(10):973-9. DOI: 10.1002/pd.1540.
18. Benacerraf B, Frigoletto Jr F, Laboda L. Sonographic diagnosis of Down syndrome in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 153(1): 49-52. DOI: 10.1016/0002-9378(85)90588-5.
19. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics; Committee on Genetics; Society for Maternal-Fetal Medicine. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstet Gynecol.* 2020;136(4):e48-e69. DOI: 10.1097/AOG.0000000000004084.
20. Bromley B, Lieberman E, Shipp T, Benacerraf B. The genetic sonogram: a method of risk assessment for Down syndrome in the second trimester. *J Ultrasound Med.* 2002; 21: 1087-96; quiz 97-8. DOI:10.7863/jum.2002.21.10.1087
21. Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO, *et al.* ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):102-13. DOI: 10.1002/uog.12342.
22. Szabo J, Gellen J. Nuchal fluid accumulation in trisomy 21 detected by vaginosonography in first trimester. *Lancet.* 1990; 336:1133. 1990; DOI: 10.1016/0140-6736(90)92614-n
23. Nicolaides K, Azar G, Byrne D, *et al.* Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimestre of pregnancy. *Br Med J.* 1992; 304:867-9. (6831):867-9. DOI: 10.1136/bmj.304.6831.867.
24. Souka A, Von-Kaisenberg C, Hyett J, Sonek J, Nicolaides K. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(4):1005-1021. DOI: 10.1016/j.ajog.2004.12.093.
25. Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, Gajewska K, Nicolaides KH. Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstet Gynecol.* 2006;107:6-10. DOI: 10.1097/01.AOG.0000191301.63871.c6.
26. Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides K. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study.

- Lancet. 2001; 358(9294):1665-67. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06709-5.
27. Wald N, Watt H, Hackshaw A. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of test performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med.* 1999; 341(7):461-67. DOI: 10.1056/NEJM199908123410701.
  28. Wald N, Hackshaw A. Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000; 14(4):563-80. DOI: 10.1053/beog.2000.0097.
  29. Cuckle H. Integrating antenatal Down's syndrome screening. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2001; 13(2):175-81. DOI: 10.1097/00001703-200104000-00013.
  30. Nicolaides K, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first trimester screening for trisomy 21 in 78.821 pregnancies. Results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25:221-6. DOI: 10.1002/uog.1860.
  31. Sehnert A, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, *et al.* Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem.* 2011; 57(7): 1.042-9. DOI: 10.1373/clinchem.2011.165910.
  32. Palomaki G, Kloza E, Lambert G, Haddow J, Neveux L, Ehrich M, *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913-20. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182368a0e.
  33. Chiu R, Akolekar R, Zheng Y, Leung T, Sun H, Chan K, *et al.* Non-invasive prenatal assesment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large-scale validation study. *Br Med J.* 2011; 342:c7401. DOI: 10.1136/bmj.c7401
  34. Sparks A, Struble C, Wang E, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: Evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):319.e19. DOI: 10.1016/j.ajog.2012.01.030
  35. Sparks A, Wang E, Struble C, Barrett W, Stokowski R, McBride C, *et al.* Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012;32(1):3-9. DOI: 10.1002/pd.2922.
  36. Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, *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.e1-8. DOI: 10.1016/j.ajog.2012.05.021.
  37. Liang D, Lu W, Wong H, Xu L, Liu J, Li H, *et al.* Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prent Diagn.* 2013; 33(5): 409-15. DOI: 10.1002/pd.4033.
  38. Yao H, Jiang F, Hu H, Gao Y, Zhu Z, Zhang H, *et al.* Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: Initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(1):17-24. DOI: 10.1002/uog.13361.
  39. Yu S, Chan K, Zheng Y, Yiang P, Liao G, Sun H, *et al.* Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(23):8583-8. DOI: 10.1073/pnas.1406103111.
  40. Gil M, Quezada M, Revello R, Akolekar R, Nicolaidis K. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015; 45(3): 249-66. DOI: 10.1002/uog.14791.
  41. Pierce B. *Genética. Un enfoque conceptual.* 2a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
  42. Rodríguez I, Barrera H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia. UANL [Internet].* 2004 [consultado 25 de octubre de 2022];VII(3):323-35. Disponible en [http://eprints.uanl.mx/1584/1/art\\_cadena.pdf](http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf)
  43. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977; 74(12): 5463-7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
  44. Sanger F. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev Biochem.* 1988. 57:1-28. DOI: 10.1146/annurev.bi.57.070188.000245.
  45. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262 (4): 56-65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56.
  46. Morley A. Digital PCR A brief history. *Biomol Detect Quantif.* 2014; 11:1-2. DOI:10.1016/j.bdq.2014.06.001
  47. Vogelstein B, Kinzler K. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1999; 96(16):9236-41. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9236.
  48. Quan P, Sauzade M, Bronzes E. dPCR: A technology review. *Sensors.* 2018; 18, 1271. DOI: 10.3390/s18041271.
  49. Margulies M, Egholm M, Altman W, Attiya S, Bader J, Bemben L, *et al.* Genome sequencing in microfabricated high density picolitre reactors. *Nature.* 2005; 437:376-80. DOI: 10.1038/nature03959.
  50. Shendure J, Porreca G, Reppas N, Lin X, McCutcheon J, Rosenbaum A, *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science.* 2005; 309(5741): 1728-32. DOI: 10.1126/science.1117389.
  51. Mardis E. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.
  52. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-45. DOI: 10.1038/nbt1486.
  53. Voelkerding K, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem.* 2009;55(4):641-58. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789.

*CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO LIBRE TOTAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO. REVISIÓN NARRATIVA*

54. Boyle J, Kreisberg R, Bressler R, Killcoyne S. Methods for visual mining of genomic and proteomic data atlases. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 58. DOI: 10.1186/1471-2105-13-58
55. Chiu R, Chan K, Gao Y, Lau V, Zheng W, Leung T, *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: 20.458-63. DOI:10.1073/pnas.0810641105.
56. Fan H, Blumenfeld Y, Chitkara V, Hudgins L, Quake S. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(42): 16.266-71. 105 (42). DOI: 10.1073/pnas.0808319105.
57. Nakasato T, Ohta T, Bono H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *Pos one*. 2013; 8(10):e77910. DOI: 10.1371/journal.pone.0077910.
58. Bentley D, Balasubramanian S, Swerdlow H, Smith G, Milton J, Brown C, *et al*. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008; 456(7218):53-9. DOI: 10.1038/nature07517.
59. Rothberg J, Hinze W, Rearick T, Schultz J, Mileski W, Davey M, *et al*. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. 2011; 475:348-52. DOI: 10.1038/nature10242.
60. Ng S, Buckingham K, Lee C, Bigham A, Tabor H, Dent K, *et al*. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010; 42(1):30-5. DOI:10.1038/ng.499.
61. Breveglieri G, D'Aversa E, Finotti A, Borgatti M. Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. *Mol Diagn Ther*. 2019;23(2):291-299. DOI: 10.1007/s40291-019-00385-2.
62. Rubio S, Pacheco R, Gómez A, Perdomo S, García R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Med*. 2020;61(2). DOI: 10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs.
63. Martínez M, Méndez C, Ballesteros A, Serra V, Remohf J. Diagnóstico genético de células fetales aisladas en sangre materna. En: Pellicer A, Simón C, editores. Cuadernos de Medicina Reproductiva. Diagnóstico Prenatal. España: Editorial Médica Panamericana, SA.; 2001. p.305-312.
64. Bianchi D, Williams J, Sullivan L, Hanson T, Klinger K, Shuber A. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(4): 822-9. DOI: 10.1086/514885.
65. Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*. 1996;88(11):4390-5. DOI: 10.1182/blood.V88.11.4390.4390
66. Adinolfi M, Davies A, Sharif S, Soothill P, Rodeck C. Detection of trisomy 18 and Y-derived sequences in fetal nucleated cells obtained by transcervical flushing. *Lancet*. 1993; 342(8868):403-4. DOI: 10.1016/0140-6736(93)92816-c.
67. Bianchi D, Simpson J, Jackson L, Elias S, Holzgreve W, Evans M, *et al*. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National institute of child health and development fetal cell isolation study. *Prenat Diagn*. 2002; 22(7): 609-15. DOI: 10.1002/pd.347.
68. 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(9076):485-7. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
69. Lo Y, Tein M, Lau T, Leung T, Poon P. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62(4): 768-75. DOI: 10.1086/301800.
70. Illanes S, Daerbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill P. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev*. 2007; 83(9):563-6. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2006.11.001.
71. Smith S, Baker P. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999; 106(8): 861-2. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1999.tb08410.x.
72. Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Emault F, Flori J, *et al*. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto-and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod*. 2004; 19(3):723-4. DOI: 10.1093/humrep/deh117.
73. Zhong X, Holzgrave W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(9): 864-70. DOI: 10.1093/molehr/8.9.864.
74. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta*. 2004;25 Suppl A:S93-S101. DOI: 10.1016/j.placenta.2004.01.005.
75. Ashoor G, Syngelaki A, Poon L, Rezende J, Nicolaides K. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;41(1):26-32. DOI: 10.1002/uog.12331.
76. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013;33(7):662-6. DOI: 10.1002/pd.4119.
77. Lo Y, Zhang J, Leung T, Lau T, Chang A, Hjelm N. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24. DOI: 10.1086/302205
78. Lo Y, Chiu R. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012; 13: 285-306. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.

79. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14753-8. DOI: 10.1073/pnas.0503335102.
80. Chiu R, Chim S, Wong I, Wong C, Lee W, To K, *et al*. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol*. 2007; 170:941–950. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060641.
81. Old R, Crea F, Puszyk W, Hulte'n M: Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2007; 15:227–235. DOI: 10.1373/clinchem.2007.098731.
82. Chim S, Jin S, Lee T, Lun F, Lee W, Chan L, *et al*. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem*. 2008; 54:500–511. DOI: 10.1373/clinchem.2007.098731.
83. Papageorgiou E, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, *et al*. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1609–18. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081038).
84. Hou Y, Yang J, Qi Y, Guo F, Peng H, Wang D, *et al*. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction: statistical analysis of 13,661 maternal plasmas for non-invasive prenatal screening. *Hum Genomics*. 2019; 13:62. DOI: 10.1186/s40246-019-0244-0.
85. Zhong X, Burk M, Troeger C, Jackson L, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn*. 2000; 20(10):795-8. DOI: 10.1002/1097-0223(200010)20:10<795::aid-pd897>3.0.co;2-p.
86. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides K. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(6):698-704. DOI: 10.1002/uog.15851.
87. Galeva S, Gil M, Konstantinidou L, Akolekar R, Nicolaides K. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019;53(6):804–9. DOI: 10.1002/uog.20290.
88. Burns W, Koelper N, Barberio A, Deagostino M, Mennuti M, Sammel M, *et al*. The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction. *Prenat Diagn*. 2017;37(11):1125–9. DOI: 10.1002/pd.5152.
89. Levine R, Quan C, Leshane E, Yu K, England L, Shisterman E, *et al*. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190(3):707-13. DOI: 10.1016/j.ajog.2003.12.019.
90. Dhallan R, Au W, 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(9):1114-9. DOI: 10.1001/jama.291.9.1114.
91. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, *et al*. Non-invasive prenatal aneuploidy testing at chromosomes 13, 21, 18, X and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn*. 2012;32(13):1233–41. DOI: 10.1002/pd.3993.
92. Levy B. Non-invasive prenatal aneuploidy testing: Technologies and clinical implication [Internet]. Medical Laboratory Observer. 2013 [consultado octubre de 2022]; Disponible en: <https://www.mlo-online.com/home/article/13005288/non-invasive-prenatal-aneuploidy-testing-technologies-and-clinical-implications>.
93. Morozova O, Marra M. Applications of next generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 2008;92(5):255-64. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.07.001.
94. Goodwin S, McPherson J, McCombie W. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016; 17(6):333-51. DOI: 10.1038/nrg.2016.49.
95. Illumina [Internet]. San Diego CA: Illumina Sequencing Technology; 2015 [consultado enero de 2023]. Disponible en: <http://illumina.com>
96. Zhang W, Cui H, Wong L. Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. *Top Curr Chem*. 2014; 336(1):19-45. DOI: 10.1007/128\_2012\_325.
97. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1932-1941. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
98. Pennisi E. Genomics. Semiconductors inspire new sequencing technologies. *Science*. 2010;327(5970):1190. DOI: 10.1126/science.327.5970.1190.
99. Rava R, Srinivasan A, Sehnert A, Bianchi D. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem*. 2014; 60(1):243-50. DOI: 10.1373/clinchem.2013.207951.
100. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, *et al*. Clinical application of massively parallel pregnancy-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn*. 2012; 32(13):1225-32. DOI: 10.1002/pd.4002.
101. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, *et al*. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health*. 2015;7:113-26. DOI: 10.2147/IJWH.S67124.

*CRIBADO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO LIBRE TOTAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO. REVISIÓN NARRATIVA*

102. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2015;126(3):e31-e37. DOI: 10.1097/AOG.0000000000001051.
103. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 2013;92(2):167-76. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.12.006.
104. Audibert F, De Bie I, Johnson JA, Okun N, Wilson RD, Armour C, *et al.* No. 348-Joint SOGC-CCMG Guideline: Update on Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy, Fetal Anomalies, and Adverse Pregnancy Outcomes. *J Obstet Gynaecol Can.* 2017;39(9):805-817. DOI: 10.1016/j.jogc.2017.01.032.
105. Canick J, Palomaki G, Kloza E, Lambert G, Haddow J. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):667-74. DOI: 10.1002/pd.4126.
106. Gregg A, Skotko B, Benkendorf J, Monaghan K, Bajaj K, Best R, *et al.* Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016;18(10):1056-65. DOI: 10.1038/gim.2016.97.
107. Skotko B, Allyse M, Bajaj K, Best R, Klugman S, Leach M, *et al.* Adherence of cell-free DNA noninvasive prenatal screens to ACMG recommendations. *Genet Med.* 2019; 21(10):2285-92. DOI: 10.1038/s41436-019-0485-2.
108. Wright D, Wright A, Nicolaidis K. A unified approach to risk assessment for fetal trisomies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015; 45(1): 48-54. DOI: 10.1002/uog.14694.
109. Minear M, Lewis C, Pradhan S, Chandrasekharan S. Global perspectives on clinical adoption of NIPT. *Prenat. Diagn.* 2015; 35(10): 959-67. DOI: 10.1002/pd.4637.
110. Norton M, Jacobsson B, Swamy G, Laurent L, Ranzini A, Brar H, *et al.* Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1589-97. DOI: 10.1056/NEJMoa1407349.
111. Bianchi D, Chiu R. Sequencing of Circulating Cell-free DNA During Pregnancy. *N Engl J Med.* 2018;379(5):464-73. DOI: 10.1056/NEJMra1705345.
112. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman O, Madan J, *et al.* Open 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. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010002.
113. Gil M, Accurti V, Santacruz B, Plana M, Nicolaidis K. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(3):302-14. DOI: 10.1002/uog.17484.
114. Maiz N, Alzola I, Murua E, Rodriguez J. Cell-free DNA testing after combined test: factors affecting the uptake. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(21):3558-62. DOI: 10.3109/14767058.2016.1138467.
115. Snyder M, Simmons L, Kitzman J, Coe B, Henson J, Daza R, *et al.* Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med.* 2015; 372(17):1639-45. DOI:10.1056/NEJMoa1408408
116. Zhou X, Sui L, Xu Y, Song Y, Qi Q, Zhang J, *et al.* Contribution of maternal copy number variations to false positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2017; 37(4):318-322. DOI:10.1002/pd.5014
117. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: A review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn.* 2016;36(5):391-6. DOI: 10.1002/pd.4804.
118. Palomaki G, Kloza E, Lambert G, Van den Boom D, Ehrich M, Deciu C, *et al.* Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn.* 2015; 35(3): 289-293. DOI: 10.1002/pd.4541
119. Scheffer P, Wirjosoekarto S, Becking E, Weiss M, Bax C, Oepks D, *et al.* Association between low fetal fraction in cell-free DNA testing and adverse pregnancy outcome: a systematic review. *Prenat Diagn.* 2021; 41(10): 1287-1295. DOI: 10.1002/pd.6028
120. Hui L, Bianchi D. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: what clinicians need to know. *Prenat Diagn.* 2020; 40(2): 155-163. DOI: 10.1002/pd.5620
121. Benn P. Uniparental disomy: origin, frequency, and clinical significance. *Prenat Diagn.* 2021;41(5):564-572. DOI: 10.1002/pd.5837
122. Thurik F, Ait A, Bossers B, Woortmeijer H, Veldhuisen B, Page G, *et al.* Analysis of false positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn.* 2015; 35(8): 754-60. DOI: 10.1002/pd.4600.
123. Kalousek D, Howard P, Olson S, Barret I, Dorfmann A, Black S, *et al.* Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 1991; 11(10):743-53. DOI: 10.1002/pd.1970111002.
124. Hartwig T, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen F. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) - a systematic review. *Prenat Diagn.* 2017; 37(6):527-39. DOI: 10.1002/pd.5049.
125. Russell L, Strike P, Browne, Jacobs P. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116 (3):181-5. DOI: 10.1159/000098184.
126. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:8. DOI: 10.1186/1750-1172-5-8.
127. Bianchi D, Chudova D, Sehnert A, Bhatt S, Murray K, Prosen T, *et al.* Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA* 2015;

- 314(2):162-9. DOI: 10.1001/jama.2015.7120.
128. Amant F, Verheeecke M, Wlodarska I, Dehaspe L, Brady P, Brison N, *et al.* Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. *JAMA Oncol.* 2015; 1(6):814-9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.1883.
129. Dow E, Freimund A, Smith K, Hicks RJ, Jurcevic P, Shackleton M, *et al.* Cancer Diagnoses Following Abnormal Noninvasive Prenatal Testing: A Case Series, Literature Review, and Proposed Management Model. *JCO Precis Oncol.* 2021;5:1001-1012. DOI: 10.1200/PO.20.00429.
130. Kalousek DK, Barrett IJ, McGillivray BC. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am J Hum Genet [Internet].* 1989 [consultado diciembre de 2022];44(3):338-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715446/>
131. Shaffer B, Norton M. Cell-Free DNA Screening for Aneuploidy and Microdeletion Syndromes. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):13-26. DOI: 10.1016/j.ogc.2017.10.001.
132. Mennuti M, Cherry A, Morrissette J, Dugoff L. Is it time to sound an alarm about false-positive cell-free DNA testing for fetal aneuploidy? *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 209(5):415-9. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.03.027.
133. Van Opstal D, Van Maarle M, Lichtenbelt K, Weiss M, Schuring H, Bholá S, *et al.* Origin and clinical relevance of chromosomal aberrations other than the common trisomies detected by genome-wide NIPS: Results of the TRIDENT study. *Genet Med.* 2018;20(5):480-5. DOI: 10.1038/gim.2017.132.
134. Devers P, Cronister S, Ormond K, Facio F, Brasington C, Flodman P. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: The position of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns.* 2013; 22(3):291-5. DOI: 10.1007/s10897-012-95-64-0.
135. Committee Opinion No. 693: Counseling About Genetic Testing and Communication of Genetic Test Results. *Obstet Gynecol.* 2017;129(4):e96-e101. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002020.
136. Sachs A, Blanchard L, Buchanan A, Norwitz E, Bianchi DW. Recommended pre-test counseling points for noninvasive prenatal testing using cell-free DNA: a 2015 perspective. *Prenat Diagn.* 2015; 35(10): 968-971. DOI: 10.1002/pd.4666
137. Houfek J, Soltis-vaughan B, Atwood J, Reiser G, Schaefer G. Adults' perceptions of genetic counseling and genetic testing. *App Nurs Res.* 2015;28(1):25-30. DOI: 10.1016/j.apnr.2014.03.001

Recibido: 13 de diciembre de 2023

Aprobado: 30 de marzo de 2024