



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

ADN celular libre en plasma:
más allá de la trisomía 21

Cell-free DNA in plasma:
beyond trisomy 21

Autora: Blanca Riera Begué

Director: Diego Lerma Puertas

Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia
2019

*A mis padres, quienes me han apoyado a lo largo
de toda mi vida académica*

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Tipos de ADN libre en plasma	2
2.2. Aplicaciones clínicas actuales del ADN fetal libre (<i>cff ADN</i>) en plasma ..	3
2.3. Protocolo de Aragón para el diagnóstico prenatal de cromosomopatías....	4
2.4. Aplicaciones potenciales del ADN tumoral circulante en plasma	5
2.5. Procedimientos para detección de ADN libre fetal y tumoral en plasma ..	6
2.5.1. Métodos para detectar ADN fetal.....	6
2.5.2. Métodos para cuantificar y estudiar el ADN fetal.....	7
2.5.3. Análisis, detección y cuantificación del ADN circulante tumoral .	9
3. Objetivos	10
4. Material y Métodos	10
5. Palabras clave	10
6. Resultados	11
6.1. Diagnóstico Prenatal.....	11
6.1.1. Determinación de Aneuploidías de los Cromosomas Sexuales	11
6.1.2. Determinación de los Síndromes de Microdeleción.....	13
6.1.3. Determinación de Enfermedades Monogénicas	15
6.1.4. Síndrome de X frágil	18
6.1.5. Secuenciación del Exoma Fetal para el Diagnóstico Genético	19
6.2. Complicaciones Asociadas al Embarazo.....	20
6.2.1. Preeclampsia.....	20
6.2.2. Restricción del Crecimiento Intrauterino	22
6.2.3. Parto Pretérmino.....	22
6.3. Oncología Ginecológica	23
6.3.1. Cáncer de Mama.....	23
6.3.2. Cáncer de Ovario.....	25
6.3.3. Cáncer de Endometrio	27
6.3.4. Cáncer de Cervix	29
7. Discusión	31
8. Conclusiones	36
9. Bibliografía	37

1. RESUMEN

Tras la implantación en la práctica clínica del cribado prenatal de la trisomía 21 mediante la detección de ADN libre fetal en sangre materna, muchas investigaciones se han centrado en identificar nuevas aplicaciones clínicas del estudio del ADN celular libre tanto en gestantes como en pacientes oncológicos. Sin embargo, tener la capacidad técnica para detectar ciertas condiciones no implica, necesariamente, un beneficio clínico para los pacientes. Por ello, esta revisión analiza la aplicabilidad clínica de esta prueba en el diagnóstico prenatal, en la prevención de complicaciones obstétricas y su posible uso en la oncología ginecológica.

En el campo del diagnóstico prenatal, la principal indicación de esta prueba continúa siendo la detección de la trisomía 21 y, en menor medida las trisomías 13 y 18. Su utilización para las aneuploidías de los cromosomas sexuales no se recomienda para el cribado en la población general, al igual que tampoco se recomienda su uso en los síndromes de microdeleción. Mientras que, para las enfermedades monogénicas, las recomendaciones del cribado se limitan a pacientes con historia familiar o embarazo previo afecto. Por lo que, la ampliación del cribado a todas estas condiciones invalidaría uno de los beneficios más convincentes por el que se implantó esta prueba que era la reducción significativa de la realización de pruebas invasivas. En el caso de que se aplicara en la práctica rutinaria, sería necesario un asesoramiento individualizado a los progenitores y más estudios de rentabilidad para determinar la eficacia clínica real de la prueba. Con respecto a los grandes síndromes obstétricos como preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y parto pretérmino, los resultados no respaldan su uso como marcador independiente de predicción de estas complicaciones. En el campo de la oncología, la detección del ADN tumoral circulante en los cánceres ginecológicos continúa siendo una técnica bajo investigación.

After the establishment of the screening of trisomy 21 in clinical practice by detection of cell-free fetal DNA in maternal blood, many studies have focused on the identification of new applications of determination of cell-free DNA in pregnant women and cancer patients. Hence, this review analyzes the clinical applicability of this test in prenatal screening, in obstetric complication prevention and its possible use in gynaecologic oncology. In the field of prenatal screening, to date, the main indication remains detection of trisomy 21 and trisomies 13 and 18. However, its screening is not recommended neither in sex-chromosome aneuploidies for general population nor for microdeletion syndromes. Whereas, in single-gene disorders, recommendations for screening are limited to patients with a family history or previously affected pregnancy. Therefore, the extension in use of this screening for all of these disorders would have an impact on the reduction of performance of invasive tests achieved by non-invasive prenatal exams. In case that determination of cell-free foetal DNA will be applied in routine practice, it would be necessary to provide individualized counselling to parents, as well as, more studies to determine the clinical efficacy of the test. Regarding the Great Obstetric Syndromes such as preeclampsia, intrauterine growth restriction and preterm delivery, results do not support their use as an independent marker for predicting these complications. In the field of oncology, the detection of circulating-tumour DNA in gynaecological cancers continues to be a technique under investigation.

2. INTRODUCCIÓN

Se entiende como **ADN circulante** o **ADN libre** (*cell-free ADN* o *cf ADN*) a los fragmentos de ADN que se encuentran circulando fuera de las células^[1] tanto en la sangre, en la orina como en otros fluidos corporales.^[2] Fueron descritos por primera vez en 1948 por Mandel y Métais^[1] en un trabajo pionero que precedió al clásico descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ADN de Watson y Crick en 1953.

El ADN circulante se detecta como pequeños fragmentos de doble cadena, de unos 150-200 pares de bases de longitud^[3] que han sido liberados a la circulación mediante mecanismos pasivos durante la destrucción celular (apoptosis o necrosis) o mediante la liberación activa por parte de las propias células vivas.^[4]

2.1. Tipos de ADN libre en plasma

Según el origen celular, el ADN circulante se ha clasificado en distintos tipos:

- ❖ **ADN circulante normal (cell-free DNA, *cf ADN*)** procedente de células normales del organismo. Este tipo de ADN libre se encuentra presente en todas las personas en mayor o menor cantidad. En personas sanas, los niveles de *cf ADN* en plasma son bajos (aproximadamente 10-15 ng/mL de plasma); sin embargo, estos niveles pueden verse incrementados en condiciones de estrés tisular tales como en procesos inflamatorios, el ejercicio o la cirugía, entre otros.^[5]
- ❖ **ADN fetal libre de células (cell-free fetal ADN, *cff ADN*)**: se trata del ADN proveniente del feto que es detectable en mujeres gestantes. Fue descubierto en 1997 por Lo *et al.*^[6] mediante la detección de secuencias específicas del cromosoma Y como marcador en embarazos de fetos masculinos. El ADN fetal libre coexiste en el plasma materno con el ADN materno circulante y representa menos del 10% del ADN libre circulante total.^[7] Puede ser detectado desde la 4^a semana de gestación y su cantidad aumenta conforme el embarazo avanza. La fuente principal de ADN fetal libre es la apoptosis de las células trofoblásticas de la placenta; aunque hay cierta evidencia de que también exista una transferencia directa de moléculas de ADN entre el feto y la madre a través de la placenta o membranas fetales.^[7]
- ❖ **ADN circulante tumoral (circulating tumor ADN, *ct ADN*)**: es el ADN libre proveniente de células de masa tumoral o de células tumorales metastásicas. La fracción de *ct ADN* tiende a aumentar conforme aumenta la carga tumoral del paciente y disminuye tras terapias curativas del cáncer.^[8] Presenta alteraciones moleculares que nos permite diferenciarlo del ADN circulante normal.^[9]

2.2. Aplicaciones clínicas actuales del ADN fetal libre (*cff ADN*) en plasma

El descubrimiento del ADN fetal libre supuso un antes y un después en el campo del diagnóstico prenatal no invasivo ya que abría la puerta a la posibilidad de detectar alteraciones en el ADN fetal (*cff ADN*) sin necesidad de realizar procedimientos invasivos que pudieran poner en riesgo la salud de la madre o la del niño.

- La aplicación más directa de la detección de *cff DNA* en sangre materna es la **determinación del sexo del feto**. La presencia o ausencia de secuencias específicas del cromosoma Y (como las secuencias del gen SRY) permiten la determinación del sexo fetal a partir de la 7^a semana postmenstrual con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% a partir de la 10^a semana.^[7] El conocimiento del sexo fetal puede ser útil como primer paso en el diagnóstico prenatal de **enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X** como hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne o de Becker.^[10] En estos casos, si las madres portadoras de la mutación tienen fetos de sexo femenino no necesitan someterse a técnicas de diagnóstico invasivo ya que los fetos serán o portadores de la mutación o sanos. Pero, si se diagnostica la presencia del cromosoma Y, existe una probabilidad del 50% de que el feto padezca la enfermedad por lo que estaría indicada la realización de una técnica de diagnóstico prenatal invasiva.^[11]
- La **determinación del RhD fetal** ha sido ampliamente utilizada desde que se demostró que era posible su detección en plasma materno en 1998 por Lo *et al.*^[11] La enfermedad hemolítica perinatal está ocasionada por la incompatibilidad sanguínea que se produce en gestantes RhD negativas (RhD-) portadoras de fetos RhD positivos (RhD+) lo que desencadena la producción de anticuerpos anti-D en la gestante que, en futuros embarazos, pueden atravesar la placenta y unirse a eritrocitos fetales RhD+ produciendo anemia fetal severa.

Desde la introducción de la profilaxis preventiva, el riesgo de inmunización anti-RhD se ha reducido de manera considerable; sin embargo, se ha estimado que el 40% de las mujeres RhD- con parejas RhD+ heterocigotas recibe una dosis innecesaria de inmunoglobulina anti-D ya que son portadoras de fetos RhD negativos. Por lo tanto, la determinación de RhD fetal haría posible evitar la administración de la gammaglobulina en mujeres sin riesgo de inmunización. En Francia, Holanda o Reino Unido, este procedimiento de detección del RhD fetal forma parte de la rutina clínica y ha conseguido unas cifras de sensibilidad y especificidad del 95 y 100%.^[7] Según Manzanares Galán *et al.*^[12] si aplicáramos esta nueva estrategia de detección de RhD fetal a las gestantes RhD- (se estima que son el 40% de las gestantes) se ahorrarían, aproximadamente, 4800€ por cada 1000 partos en profilaxis innecesarias.^[12]

- En 2011, la detección de *cff ADN* en sangre materna comenzó a emplearse en la práctica médica en el **diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidías fetales**.

En la población general, las aneuploidías tienen una incidencia de 9 por cada 1000 nacidos vivos. La más frecuente es la trisomía 21 (Síndrome de Down) con una incidencia de 1 por cada 600-800 nacidos vivos, le sigue la trisomía 18 (Síndrome de

Edwards) con una incidencia de 1 por cada 5.500 nacidos vivos y la trisomía 13 (Síndrome de Patau) con 1 de cada 12.000 nacidos vivos.^[13]

Antes de la implantación de *cff ADN* en el diagnóstico prenatal, el cribado para detectar el riesgo de anomalías fetales en el primer trimestre se basaba en el **cribado combinado del primer trimestre (CCPT)**. Sin embargo, según Malone *et al.*^[14] la sensibilidad de este test para la trisomía 21 era únicamente del 84-90%, con una tasa de falsos positivos del 5% (Figura 1). El CCPT calcula el riesgo de aneuploidías basado en estos factores:

- a) Edad materna
- b) Analítica de sangre materna entre la semana 9 y 13 de gestación en la que se determinan la concentración de la fracción libre de β gonadotropina coriónica humana (β hCG) y de la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A).
- c) Ecografía entre la semana 11 a la 13+6 para medir la longitud cráneo-caudal (CRL) y la translucencia nucal (TN)

Tras el descubrimiento del ADN fetal libre, se implantó en el protocolo del cribado prenatal no invasivo y, gracias a él, se han logrado grandes avances en el campo del diagnóstico prenatal. De hecho, el meta-análisis de Gil *et al.*^[15] en 2017 evaluó la capacidad diagnóstica de la detección de *cff ADN* estableciendo una sensibilidad y una tasa de falsos positivos para la trisomía 21 del 99.7% y 0.04%. Además, analizó otras aneuploidías menos frecuentes.^[15] (Tabla 1)

Tabla 1. Rendimiento del cribado mediante detección de ADN fetal en sangre materna de las aneuploidías más comunes.^[15]

	Trisomía 21	Trisomía 18	Trisomía 13
Sensibilidad	99.7 %	97.9%	99.0%
TFP*	0.04%	0.04%	0.04%

*TFP: Tasa de Falsos Positivos

Es relevante mencionar que los datos de este metaanálisis sugerían que la sensibilidad real de la prueba de detección del *cff ADN* para trisomías 18 y 13 podían ser menores que las halladas ya que las estimaciones se realizaron excluyendo las muestras no concluyentes. Una de las razones principales de no obtener resultado es la baja fracción de ADN fetal disponible en sangre materna. En las trisomías 18 y 13 (no en la trisomía 21) la fracción fetal es más baja y, por tanto, la exclusión de las muestras no concluyentes, pueden llevar a un grado de sesgo que resultaría en una sobreestimación de la sensibilidad y una subestimación de los falsos positivos.^[15]

2.3. Protocolo para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas en Aragón

Dado su elevado precio, en la práctica clínica, el análisis del ADN fetal en sangre materna no se aplica indiscriminadamente en todas las gestantes, sino que se seleccionan un grupo de la población en el que se agrupan la mayor parte de la aneuploidías.

En el momento actual, según el protocolo de la Comunidad Autónoma de Aragón,^[16] el procedimiento recomendado en primer lugar para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas es el cribado combinado del primer trimestre (CCPT) con el que se estima el riesgo individualizado de cada gestante de tener un feto afecto de aneuploidía y se clasifica a las gestantes en tres grupos: bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo.

Tabla 2. Resumen de la conducta a seguir según el riesgo estimado en el CCPT

Riesgo a priori de cromosomopatía	Conducta a seguir
Bajo riesgo	<1/1000
Riesgo intermedio	1/51 a 1/999
Alto riesgo	>1/50

En las gestantes de bajo riesgo, no es necesario hacer pruebas adicionales. En las de alto riesgo, se ofrece directamente la prueba invasiva (amniocentesis o biopsia corial). Sin embargo, en las gestantes de **riesgo intermedio** se considera que existe un riesgo moderado de aneuploidías y la gran mayoría de fetos de este grupo serán normales, por lo que este grupo es la indicación principal para solicitar la prueba de ADN fetal en sangre materna. Al tratarse de una prueba de cribado, no diagnóstica, en los casos que esta prueba de cribado resultara patológica, habría que confirmarlo con una prueba invasiva.^[16]

Esta estrategia de cribado en dos pasos, primero el cribado combinado del primer trimestre y luego la realización de test fetal no invasivo en el grupo de riesgo intermedio ha disminuido la tasa de falsos positivos y el número de técnicas invasivas.^[17]

2.4. Aplicaciones del ADN tumoral circulante en plasma

El descubrimiento del **ADN tumoral circulante** (*ct ADN*) supuso un avance que abrió nuevas vías de investigación a potenciales aplicaciones en el control de tumores:

- **Diagnóstico y perfil molecular:** aunque la biopsia tumoral continúa siendo el *gold standard*, se está investigando la posibilidad de utilizar la prueba de *ct ADN* tanto para el diagnóstico como para determinar alteraciones moleculares que sirvan como objetivos terapéuticos.^[9]
- **Monitorización de la respuesta al tratamiento:** los niveles de *ct ADN* se correlacionan bien con los cambios en la carga tumoral y la respuesta al tratamiento.^[8] Por lo que, gracias a su corta vida media, el *ct ADN* supone una ventaja para medir la carga tumoral en tiempo real tras una terapia concreta, a diferencia de los marcadores tumorales (CEA o CA-125) que tienen vidas medias más largas.^[9] Por ejemplo, tras cirugía curativa, el análisis de *ct ADN* podría detectar **actividad tumoral residual** para identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de una terapia adyuvante y evitar la quimioterapia en pacientes curados.^[9]

Por otra parte, el análisis de *ctADN* podría mostrar la **heterogeneidad molecular** del tumor mejor que la biopsia (figura 2) e identificar, antes de establecer un tratamiento, poblaciones clonales con alteraciones moleculares causantes de futuras resistencias^[9]

Además, este análisis puede aplicarse para el **manejo de resistencias** y el uso de **terapias dirigidas**. Por ejemplo, en el cáncer de pulmón no microcítico, tras la terapia con inhibidores de EGFR, el análisis de *ct ADN* identificó la aparición de mutaciones en T790M causante de resistencia al tratamiento convencional; pero que eran sensibles a inhibidores de EGFR de tercera generación. De tal forma, que el análisis de *ct ADN* ha sido aprobado como diagnóstico complementario en este cáncer para elegir terapias específicas frente a EGFR.^[18]

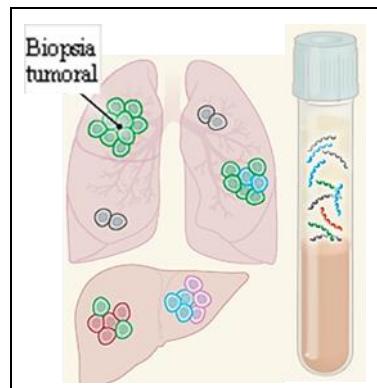


Figura 1: Ejemplo de cómo la biopsia tumoral puede no identificar la heterogeneidad molecular como el análisis de *ct ADN*.^[9]

2.5. Procedimientos para la detección de ADN libre fetal o tumoral en plasma

La mayor parte del ADN libre en plasma deriva de la ruptura de células normales del organismo; por lo que, únicamente, un pequeña fracción de ese ADN libre procederá del feto, en el caso de las gestantes, o del tumor, en el caso de pacientes oncológicos. De esta manera, para conseguir detectarlo se han necesitado desarrollar métodos especializados tanto en el aislamiento como en el análisis del ADN. La mayoría consiste en identificar peculiaridades o anomalías específicas de estos dos tipos de ADN.

2.5.1. Métodos para detectar ADN fetal

- Detección de secuencias específicas de ADN en el cromosoma Y: como el gen SRY (“sex-determining región”) o la región que codifica la proteína testicular ligada al Y (DYS14). Este es el método más fiable, pero limita el diagnóstico, únicamente, a fetos de sexo varón.^[7]
- Detección de secuencias específicas de ADN en cromosomas autosómicos: solo pueden ser útiles si el gen paterno posee características genómicas que no están presentes en la herencia materna.^[7]
- Aumento de las concentraciones relativas del *cff ADN*: el ADN libre fetal supone tan solo un 10-15% del total de ADN libre total detectado en sangre materna, lo que supone una limitación técnica para aislarlo y analizarlo. Por lo que para un mejor estudio, es necesario aumentar la concentración de ADN fetal mediante métodos de enriquecimiento.^[7]
- Modificaciones epigenéticas: se trata de diferencias somáticas del ADN que no alteran la secuencia genética pero que sí afectan a su expresión génica. El análisis de estas modificaciones permite diferenciar entre los alelos maternos propios y los fetales heredados por vía materna.^[7]

2.5.2. Métodos para cuantificar y estudiar el ADN fetal

Se han desarrollado diferentes métodos sensibles para detectar e identificar las anomalías del ADN libre fetal y, a medida que la tecnología avanza, aparecen variaciones de estos métodos de secuenciación, pero las técnicas principales que se utilizan son:

- ❖ Secuenciación selectiva de polimorfismos de un solo nucleótico (SNP). Los SNP son variaciones de una sola base en la secuencia del genoma. Este método no utiliza el recuento, sino que amplifica y secuencia alrededor de 20,000 SNP (ubicados en los cromosomas de interés) tanto de los leucocitos maternos (donde se encuentra el ADN materno) como del plasma (encontramos ADN materno y fetal). De esta manera, se analizan las diferencias entre el ADN del feto y de la madre y se averigua el genotipo fetal.^[7]
- ❖ Secuenciación masiva o NGS (Next-Generation Sequencing): se basa en el análisis en paralelo de varios millones de fragmentos cortos de ADN, ya sean maternos o fetales, seguidas de una alineación de secuencias y se comparan con un genoma euploide de referencia (Figura 2). Así se puede determinar el origen de cada fragmento y la proporción en la que se encuentra, por lo que aporta información del genoma completo del feto, de anomalías cromosómicas y subcromosómicas. A pesar de su alta sensibilidad y especificidad, la NGS muestra una tasa de error aleatorio entre 0,1% y del 1%.^[9]

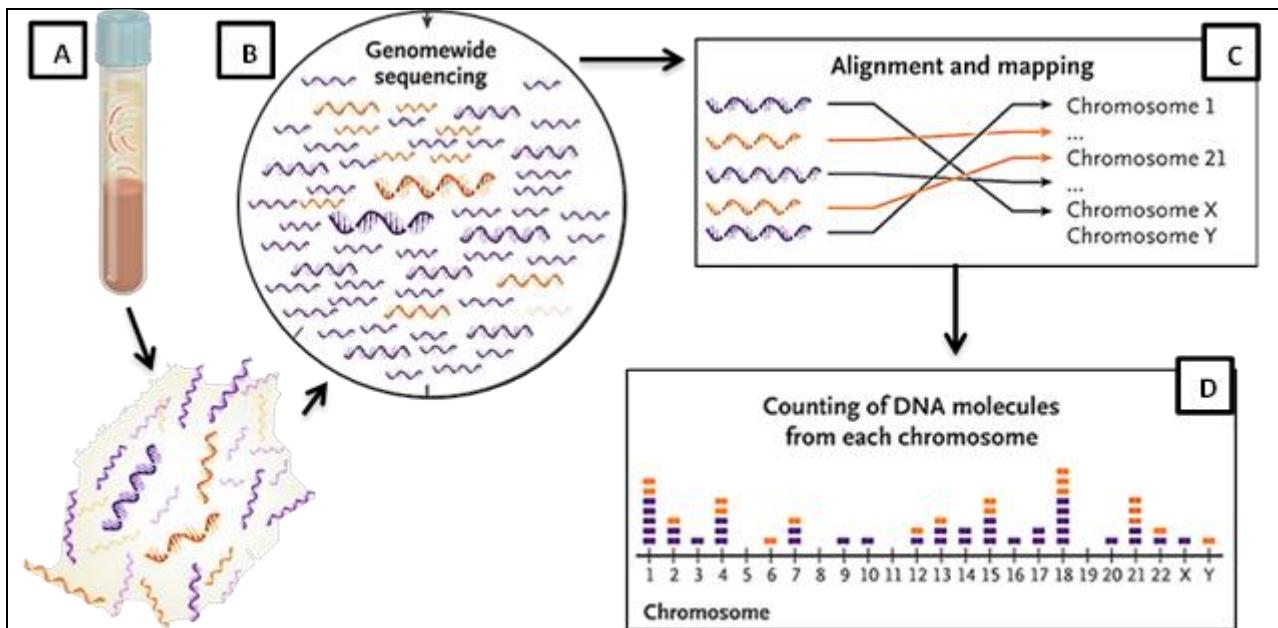


Figura 2. Técnica de secuenciación masiva en el cribado de aneuploidías fetales (A) El plasma materno contiene ADN fetal y materno. (B) Se secuencian todos los fragmentos de ADN libre tanto los de origen fetal (naranja) como los de origen materno (morado). (C) Se alinean y cuantifican el número de fragmentos que pertenecen a cada cromosoma y, después, (D) se determina la proporción de moléculas de ADN fetal que hay de cada cromosoma y se compara con una muestra de referencia. Por ejemplo, en los casos de trisomía 21 la proporción de fragmentos de ADN libre fetal del cromosoma 21 será mayor con respecto a la muestra de referencia. Adaptado de Bianchi *et al.*^[19]

La tecnología NGS permite la secuenciación de diferentes tipos:

- Secuenciación del genoma completo (WGS, Whole-Genome Sequencing Sequencing) se realiza mediante la secuenciación simultánea de todo el ADN libre. Tiene la ventaja de que proporciona una amplia cobertura de todo el genoma y permite la identificación de variante a lo largo de todo el genoma; sin embargo, esto incrementa los costes y el tiempo de análisis, por tanto limita su implementación en el diagnóstico de rutina. ^[20]
- Secuenciación del exoma completo (WES, Whole-Exome Sequencing) el objetivo de esta técnica es la secuenciación de los exones codificantes de todos los genes conocidos (Figura 3). Se denomina exoma al conjunto de genes codificadores de proteínas (exones) dentro del genoma humano completo. Supone únicamente el 1,5 % del ADN (unos 22.000 genes), pero se estima que el 85% de las mutaciones que causan enfermedades se localiza en esa porción del ADN. Esta técnica permite la identificación de nuevos genes en enfermedades con base molecular desconocida y, además es más costo-efectiva que WGS. ^[20]
- Secuenciación de genes diana (*Targeted Sequencing*): este enfoque se desarrolló para mejorar la eficiencia de la secuenciación. Los fragmentos de ADN libre en el plasma se someten a un proceso de enriquecimiento: se localizan de forma selectiva zonas concretas del genoma (por ejemplo, cromosoma 21, 18, 13, X o Y) y se secuencian simultáneamente. El resultado del recuento se establece como el riesgo de presentar la anomalía, ajustada por edad materna y gestacional. Con este método se reduce el coste y el tiempo de secuenciación, pero, el problema es que solo aquellos genes que se han asociado con una enfermedad pueden ser incluidos en el panel de genes. ^[20]

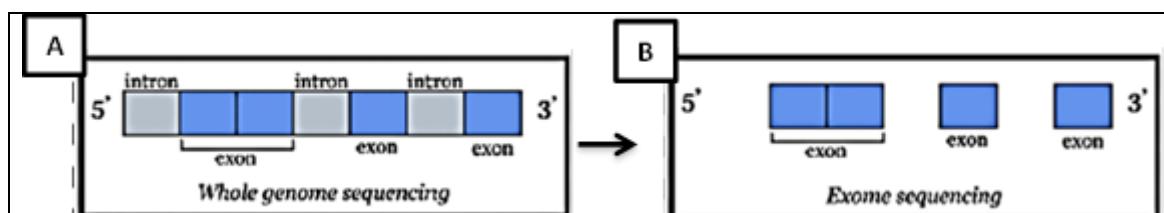


Figura 3. Las nuevas tecnologías genómicas como la secuenciación del genoma completo (A) y la secuenciación del exoma completo (B) tienen la capacidad de analizar el genoma fetal de manera más exhaustiva. Adaptado de Hardisty *et al.* ^[21]

2.5.3. Análisis, detección y cuantificación del ADN circulante tumoral

Para diferenciar entre el ADN libre normal del paciente y el ADN tumoral circulante (*ct ADN*) las técnicas se basan en identificar mutaciones específicas, cambios en el número de copias, fusión de genes o cambios en la metilación del ADN. Por ejemplo, en el cáncer colorrectal se han detectado mutaciones de la vía RAS responsables de la progresión del tumor. Mientras que en el cáncer de pulmón se ha observado que mutaciones en el gen EGFR se relacionan con tumores resistentes al tratamiento.

En este campo también se han desarrollado métodos ultrasensibles para detectar las bajas concentraciones del *ct ADN* en la sangre del paciente:

- ❖ Se utilizan sobre todo la técnica **NGS** que, al igual que en el análisis del ADN libre fetal, permite detectar anomalías analizando genes específicos o bien todo el genoma o todo el exoma del ADN tumoral circulante.^[22] Esta técnica tiene la ventaja de poder detectar una gran cantidad de alteraciones tumorales en todo el genoma de la muestra.
- ❖ Para la detección de mutaciones puntuales, se recomienda la utilización de técnicas basadas en la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** ya que permite detectar alteraciones específicas del ADN de la muestra y se evita la secuenciación de todo el genoma como en *NGS*. La PCR consiste en amplificar los fragmentos de ADN libre (normal y tumoral) de la muestra y marcar mediante una sonda fluorescente las mutaciones buscadas. De tal manera que, según la cantidad de señal que se capte de la muestra, se establece la proporción de alelos con ADN mutado o con ADN normal. Estos métodos proporcionan una alta sensibilidad, pero es necesario conocer previamente las mutaciones puntuales específicas del tumor que se busca. Sin embargo, su bajo coste y la rapidez de realización de la técnica, convierte a la PCR en una herramienta muy útil para estos cánceres.^[22]

Gracias al incremento y al avance de las técnicas de secuenciación y de análisis del ADN libre, hoy en día, se están evaluando nuevas aplicaciones clínicas de esta técnica en el diagnóstico prenatal para detectar enfermedades monogénicas, síndromes de microdeleción o microduplicación, así como, detectar con antelación el desarrollo de trastornos durante el embarazo. En el campo de la oncología ginecológica se están estudiando posibles aplicaciones en los cánceres ginecológicos más frecuentes como el de mama, ovario, cérvix y endometrio. Todo ello es objeto de esta revisión.

3. OBJETIVO

Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo analizar la aplicabilidad clínica de las técnicas de detección de ADN celular libre en plasma tanto en el diagnóstico prenatal no invasivo para identificar aneuploidías de los cromosomas sexuales, enfermedades monogénicas, síndromes de microdeleción o microduplicación como para la prevención de complicaciones obstétricas tales como la preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y el parto pretérmino. Además, también se analizarán las aplicaciones de esta prueba en el campo de la oncología ginecológica.

4. MATERIAL y MÉTODOS

El método utilizado para este trabajo ha sido una revisión bibliográfica en la literatura médica de artículos de investigación mediante el motor de búsqueda PUBMED en la base de datos de MEDLINE. Además se hizo una búsqueda en las páginas web de The Fetal Medicine Foundation y Revista de Genética Médica.

Se estableció una estrategia de búsqueda para cada campo de análisis:

- En el diagnóstico prenatal no invasivo se utilizaron las palabras clave: prenatal screening, cell-free fetal DNA, aneuploidies, single gene disorders, microdeletion syndrome, sex chromosome aneuploidies
- En el diagnóstico de síndrome obstétricos se realizó una búsqueda con las siguientes palabra clave: cell-free fetal DNA, pre-eclampsia, preterm birth, preterm delivery, intrauterine growth restriction.
- En el campo de la oncología ginecológica se utilizaron los siguientes términos de búsqueda: cell free DNA o circulating tumor DNA, breast cancer, uterine cervical cancer, ovarian cancer, endometrial cancer.

También se han utilizado protocolos de distintas organizaciones profesionales como la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia), la ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology), la ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) y la ISPD (International Society of Prenatal Diagnosis).

Los criterios de inclusión para elección de los artículos fueron aquellos que habían sido publicados en un plazo no mayor a 5 años, en idiomas en español e inglés, investigaciones llevadas a cabo en humanos de género femenino. Rechazamos aquellos artículos que no cumplieran dichos criterios.

5. PALABRAS CLAVE

Prenatal screening, cell-free fetal DNA, aneuploidies, single gene disorders, microdeletion syndrome, sex chromosome aneuploidies, pre-eclampsia, preterm birth, preterm delivery, intrauterine growth restriction, cell-free DNA, circulating tumor DNA, breast cancer, uterine cervical cancer, ovarian cancer, endometrial cancer.

6. RESULTADOS

6.1. DIAGNÓSTICO PRENATAL

6.1.1. Determinación de Aneuploidías de los Cromosomas Sexuales

Las aneuploidías cromosómicas sexuales son trastornos causados por la existencia de un número anómalo de los cromosomas X o Y. Estos trastornos están asociados a una gran variedad de manifestaciones clínicas: algunos pacientes son asintomáticos o únicamente presentan síntomas leves, mientras que otros desarrollan síntomas graves como trastornos del comportamiento, infertilidad, retraso en el desarrollo o en el aprendizaje.^[23] Las aneuploidías más frecuentes son 45 XO (síndrome de Turner o monosomía X), 47 XXX (síndrome triple X), 47 XXY (síndrome de Klinefelter) y el 47 XYY. Su prevalencia conjunta se calcula en 1 de cada 350-400 nacidos vivos,^[23] aunque, individualmente, varía. (Tabla 3)

Tabla 3. Prevalencias de las Aneuploidías de cromosomas sexuales

45 XO – Síndrome de Turner	1: 2000-5000 mujeres nacidas vivas
47 XXX – Síndrome Triple X	1: 1000 mujeres nacidas vivas
47 XXY – Síndrome de Klinefelter	1: 600 varones nacidos vivos
47 XYY	1: 1000 varones nacidos vivos

* Guillen-Navarro E. Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Pediatría: Genética/ Dismorfología. AEP:2010.

Cabe destacar que, salvo el síndrome de Turner (45 XO) que, en ocasiones, puede ser diagnosticado en la ecografía prenatal tras encontrar higroma quístico o defectos cardíacos, la mayoría de estas aneuploidías no suelen presentar un fenotipo diagnosticable ecográficamente o con la bioquímica del suero materno. De hecho, antes de la existencia de los test fetales no invasivo, se diagnosticaba de forma incidental al realizar cariotipos por otras causas. Por lo tanto, la prueba de detección decff ADN en sangre materna resultaba una técnica atractiva para detectar este tipo de trastornos.^[7]

En un meta-análisis realizado en 2017, Gil *et al.*^[15] analizaron la capacidad diagnóstica de la prueba para las cromosomopatías sexuales y estableció una sensibilidad del 95,8% y una tasa de falsos positivos del 0,14% para la monosomía X o síndrome de Turner, mientras que para el resto de aneuploidías de los cromosomas sexuales informó de que el test fetal no invasivo presentaba una sensibilidad casi del 100% y una tasa de falsos positivos del 0,004%.^[15] (Tabla 4). Cabe señalar que las publicaciones analizadas en este meta-análisis en algunas incluían población de alto riesgo y en otras analizaban población mixta (alto y bajo riesgo).

Tabla 4: Rendimiento de la prueba de detección de ADN libre fetal en sangre materna para las aneuploidías de los cromosomas sexuales

	Sensibilidad	Tasa Falsos Positivos (TFP)
Monosomía X (45 XO)	95,80%	0,14 %
Otras aneuploidías (47 XXX, 47 XXY, 47 XYY)	100,00%	0,004%

Adaptado de Gil MM *et al.*^[15]

En cuanto a la eficacia del test, diversos autores han estudiado el valor predictivo positivo de la prueba (probabilidad de tener un feto afecto cuando la prueba da un resultado positivo). Petersen *et al.*^[24] examinó las muestras de 712 mujeres que obtuvieron un resultado alterado o no concluyente en el test fetal no invasivo y calculó el valor predictivo positivo de la prueba (VPP) para las aneuploidías de los cromosomas sexuales: 27% para la monosomía X, 85% para XXY, 45% para triple X.^[24] (Tabla 5)

Datos parecidos reportó Suo *et al.*^[25] quien utilizó el test fetal no invasivo (TFNI) para buscar aneuploidías de los cromosomas sexuales en muestras de más de 8000 gestantes tanto de alto como bajo riesgo y establecieron el VPP de la prueba para cada aneuploidía: 32,43% para la monosomía X, 60,00% en XXY, 55,56% para el triple X y 87,50% en el síndrome XYY.^[25] (Tabla 5)

Tabla 5. Tasas de valor predictivo positivo (VPP) de cuatro aneuploidías de los cromosomas sexuales basados en los datos publicados.

	Petersen <i>et al.</i> ^[24] VPP	Suo <i>et al.</i> ^[25] VPP	Zhang <i>et al.</i> ^[26] VPP
Población	Mujeres de alto riesgo	Mujeres de alto y bajo riesgo	Mujeres de alto y bajo riesgo
XO	27 %	32,43 %	29,41 %
XXY	85 %	60,00 %	77,78 %
XXX	45 %	55,56 %	100,00 %
XYY	-	87,50 %	-
Total	-	46,88 %	54,54 %

De la misma manera, Zhang *et al.*^[26] analizó la eficacia del TFNI para detectar este tipo de aneuploidías en gestantes que, tras realizarles el cribado del segundo trimestre, estuvieron de acuerdo en someterse a la detección de *cff ADN* en sangre materna. El VPP general de TFNI para detectar cromosomopatías sexuales fue de 54,54%, mientras que para detectar el síndrome de Turner fue solo del 29,41% (tabla 5). Además, analizó la eficacia de la prueba según el grupo de riesgo estimado tras la realización del cribado (tabla 6).

Tabla 6. Eficacia del test fetal no invasivo estratificado para detectar aneuploidías de los cromosomas sexuales estratificado según el riesgo de presentar un feto afecto derivado del cribado del segundo trimestre.^[26]

Riesgo en el cribado prenatal	Valor predictivo positivo
• Alto riesgo	77,78 %
• Riesgo intermedio	37,50 %
• Bajo riesgo	50,00 %

Los distintos estudios coinciden en que el TFNI para aneuploidías de los cromosomas sexuales tiene una menor precisión, menor valor predictivo positivo y mayor tasa de fracaso que el TFNI para la trisomía 21. Esta menor eficacia de la detección de *cff ADN* en estos trastornos, sobre todo en la monosomía X, se ha relacionado con diferentes causas:

- La presencia de una monosomía parcial o total en la madre; así como mosaicismos maternos (46XX/45XO) podrían alterar el resultado al aumentar los falsos positivos

ya que, recordemos, el ADN libre es, mayoritariamente, de origen materno y podría no reflejar el genotipo fetal real.^[23] Wang *et al* informó que el 8,6% de los resultados positivos del *cff ADN* para las aneuploidías de los cromosomas sexuales se debieron a mosaicismos maternos.^[27]

- La presencia de un mosaicismo confinado a la placenta puede dar lugar a un resultado falso positivo del *cff ADN* y la presencia de un mosaicismo exclusivamente fetal, a un resultado falso negativo.^[23] (Figura 4).
- La existencia de un gemelo evanescente con alguna aneuploidía en X o Y también podría no reflejar el genotipo real debido a que ambos contribuyen a la fracción del ADN fetal.^[23] (Figura 4).

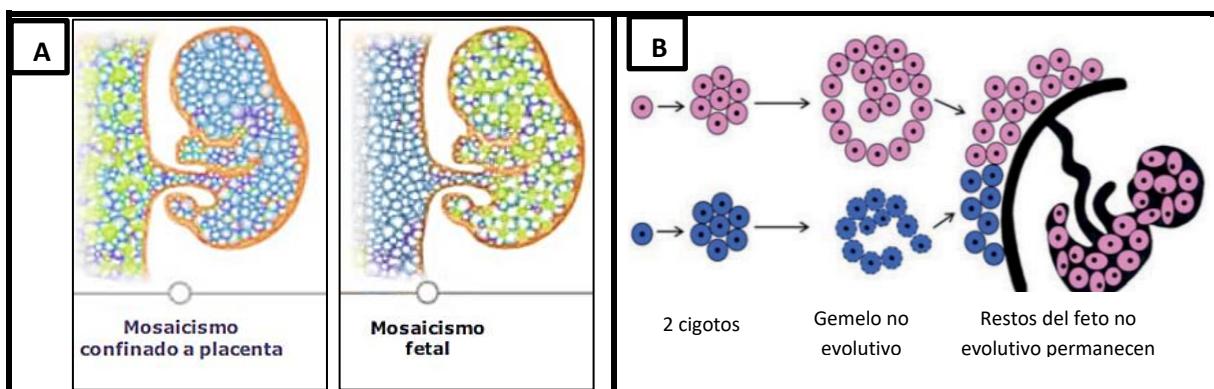


Figura 4. (A) Mosaicismo confinado a la placenta, en la placenta existen dos tipos de células con carga cromosómica distinta 45XO (verdes) y 46XX (azules). En el mosaicismo fetal, es el feto el que tiene dos tipos de células con carga cromosómica diferente. (B) En gestaciones inicialmente gemelares, la contribución de ADN en plasma de un feto no evolutivo (células azules) pueden generar resultado que no reflejen el genotipo real.^[28]

A pesar de la eficacia dudosa del TFNI para las aneuploidías cromosómicas, se está utilizando hoy en día. Por lo que, cuando se ofrece esta prueba a las gestantes para la detección de este tipo de anormalidades cromosómicas, deben ser bien asesoradas por profesionales expertos en el tema para ayudar a las familias a entender estos trastornos y los beneficios y limitaciones de los test diagnósticos. Además es importante la comunicación de la existencia de resultados discordante que podrían llegar a necesitar una evaluación adicional e incluso una técnica invasiva.^[23]

6.1.2. Determinación de los Síndromes de Microdelección

Con el avance de las técnicas de secuenciación, se han conseguido detectar anomalías cromosómicas más pequeñas como las variaciones en el número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés) también conocidas como microdelecciones y microduplicaciones.

Las CNVs se pueden asociar con fenotipos severos que incluyen retraso del desarrollo, discapacidad intelectual, características dismórficas y otras malformaciones, incluso más severas que las aneuploidías cromosómicas. Se han descrito distintos síndromes y, aunque la penetrancia y la expresividad pueden variar, todos tienen

consecuencias clínicas importantes. Estos trastornos, ya sean por microdeleción o microduplicación, ocurren en, aproximadamente, el 1-1,7% de los embarazos;^[29] pero, individualmente, cada trastorno es mucho menos común (Tabla 7). Por ello, los laboratorios que ofrecen este cribado incluyen alrededor de 6 trastornos específicos (síndrome de DiGeorge, de delección 1p36, de Prader-Willi o de Angelman, de Cri-du-Chat, de Wolf Hirschhorn) con una prevalencia combinada de 1 entre 2500.^[30]

Tabla 7. Prevalencia de las alteraciones cromosómicas que más frecuentemente son cribadas por los laboratorios comerciales. Adaptado de Advani *et al.*^[29]

	Alteración cromosómica	Prevalencia
Síndrome de DiGeorge	22q11.2	1:1000
Delección 1p36	1p36	1:5000
Síndrome de Angelman	15q11.2-q13(alelo materno)	1:12000-20000
Síndrome de Prader-Willi	15q11.2-q13(alelo paterno)	1:10000-30000
Síndrome de Cri-du-Chat	5p	1:15000-50000
Síndrome Wolf-Hirschhorn	4p16	1:20000-50000

La mayoría de estas alteraciones cromosómicas se producen *de novo*; aunque también es posible heredárlas de alguno de los progenitores. Pero, a diferencia de las aneuploidías, el riesgo de estas alteraciones no está relacionado ni con la edad materna ni con el resultado del cribado combinado, por lo que puede ser difícil detectar fetos con CNVs.^[31] De esta manera, la detección de *cff ADN* en sangre materna se presenta como una herramienta prometedora para su cribado. No obstante, la posibilidad de detectar CNVs mediante TFNI, no implica que deba incluirse necesariamente de manera sistemática en el cribado prenatal. Una de las principales preocupaciones es definir para qué síndromes se debe ofrecer el cribado prenatal no invasivo, para ello se han llevado a cabo distintos estudios de validación (Tabla 9).

Liu *et al.*^[31] evaluaron la tasa de detección de CNVs y las clasificaron en dos grupos dependiendo del número de pares de bases de cada anomalía (CNVs >10Mb y CNVs <10Mb). La prueba mostró que los CNVs con menos pares de bases conllevan una disminución en la tasa de detección ya que aumentan los falsos negativos (tabla 8). Además, debemos tener en cuenta que los valores en la práctica clínica podrían ser diferentes, ya que las muestras para este estudio procedían de grupos seleccionados y la tasa de incidencia no representaba la de una población con embarazo normal.

Tabla 8. Rendimiento de *cff ADN* para detección de CNVs según su tamaño^[32]

	CNV> 10Mb	CNV< 10Mb	Total CNVs
Sensibilidad	88.89%	72.73%	84.21%
Especificidad	99.32%	99.09%	98.42%

Otros estudios^[32,33,34,35] han intentado evaluar la capacidad diagnóstica de la prueba para los 5 CNVs que se incluyen más frecuentemente en las pruebas de cribado que ofrecen los laboratorios. Helgeson *et al.*^[32] analizó en el año 2015 más de 175.000 muestras de plasma materno y estableció un valor predictivo positivo alto (60-100%)

con una tasa global de falsos positivos de 0,0017%. Sin embargo, estos datos contrastan con estudios más recientes como Martin *et al.*^[33] que en 2018 estableció un valor predictivo positivo de 38,7% % y una tasa de falsos positivos del 0,07% .

Tabla 9. VPP de cuatro microdelecciones basadas en datos publicados

	Helgeson <i>et al.</i> ^[32]	Sahoo <i>et al.</i> ^[34]	Gross <i>et al.</i> ^[35]	Martin <i>et al.</i> ^[33]
Método de análisis	WGS	-	SNP	SNP
CDC	67%	17%	-	66,7%
PWS/AS	100%	100%	-	9,0%
DGS	97%	29%	18%	44,2%
del.1p36	60%	25%	-	50,0%

CDC: Síndrome de Cri-du-chat (5p); *DGS*: Síndrome de DiGeorge (22q11.2); *PWS/AS*: síndrome de Prader-Willi/síndrome Angelman (15q11.2-q13.1); *VPP*: valor predictivo positivo.

Estos VPP suponen altas tasas de falsos positivos, por lo que ante la existencia de falsos positivos es necesaria una confirmación del resultado mediante el diagnóstico invasivo.^[31] Además, un resultado negativo de la prueba tampoco puede descartar totalmente la posibilidad de una CNV ya que el *cff ADN* posee una tasa alta de falsos negativos.^[31] Incluso obteniendo una sensibilidad y especificidad muy altas de la prueba, con la prevalencia tan baja de cada uno de los síndromes, se limita mucho el valor predictivo positivo que mide la eficacia real de la prueba.

De esta manera, ampliar el análisis del ADN fetal para la detección de microdelecciones podría revertir el descenso del número de pruebas invasivas conseguido hasta el momento. Por esta razón, la mayoría de las guías de las organizaciones profesionales no apoyan el NIPT para el cribado de CNVs en la población general. En el caso de que esta prueba se ofreciera en la práctica clínica para los CNVs, dado el bajo valor predictivo positivo de la prueba, es fundamental el **consejo pre-test** para que los progenitores comprendan las implicaciones de los resultados de la prueba y puedan tomar decisiones de manera autónoma.

6.1.3. Determinación de Enfermedades Monogénicas

Las enfermedades monogénicas se producen como resultado de cambios en la secuencia de un locus de un solo gen y dan como resultado diversas enfermedades que se manifiestan a través de patrones de herencia predecibles: dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. Representan una proporción más significativa de enfermedades genéticas en comparación con las anomalías cromosómicas. Los últimos datos sugieren que los trastornos monogénicos graves pueden afectar entre el 0,1% y el 0,4% de todos los embarazos.^[36]

La detección de *cff ADN* para el diagnóstico de los trastornos monogénicos es una tecnología en evolución ya que, hasta hace poco tiempo, su utilización estaba limitada a la detección de mutaciones heredadas del parente, ya que la tecnología no era capaz de diferenciar el ADN libre materno del ADN fetal portador de mutaciones

maternas. Sin embargo, con la aparición de técnicas como la secuenciación masiva se han conseguido expandir el diagnóstico prenatal no invasivo a condiciones heredadas de la madre.

Tabla 10. Prevalencia de enfermedades monogénicas cuyo diagnóstico está siendo estudiando mediante la determinación del ADN libre fetal en sangre materna.

Trastornos autosómicos dominantes	· Acondroplasia	1:25.000
	· Displasia tanatofórica	1:20.000 - 50.000
	· Síndrome de Apert	1:100.000 - 160.000
	· Distrofia miotónica	1:20.000
	· Enfermedad de Huntington	1:10.000-20.000
Trastornos autosómicos recesivos	· Fibrosis quística	1: 8.000 -10.000
	· Hiperplasia adrenal congénita	1:5.000 - 15.000
	· Anemia de células falciformes	1:5.000
	· β-talasemia	1:100.000
	· Atrofia muscular espinal	1:30.000
	· Enfermedad de Gaucher	1:60.000
	· Enfermedad de Wilson	1:25.000
Trastornos ligados a cromosoma X	· Hemofilia	1:12.000
	· Distrofia muscular de Duchenne	1:3.300
	· Distrofia muscular de Becker	1:18.000-31.000

Datos obtenidos de Orphanet.^[37]

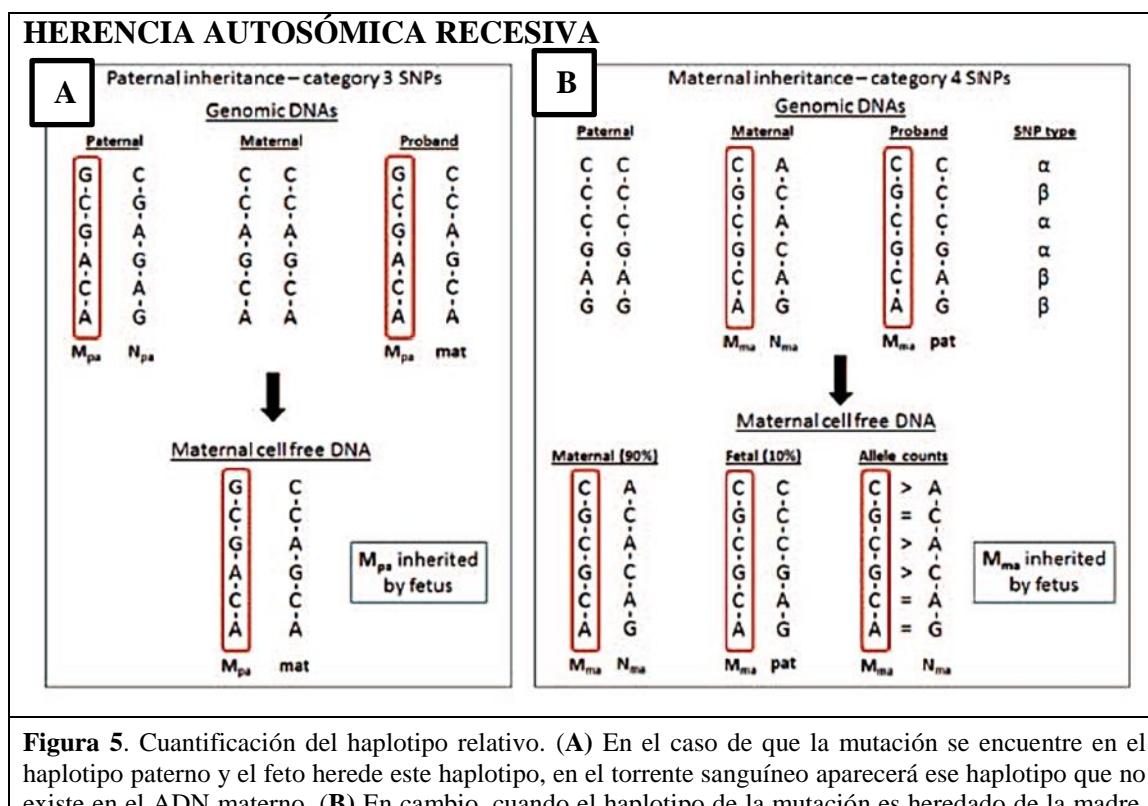
En este contexto, se dan diversos casos:

- ❖ La detección de enfermedades con **herencia autosómica dominante** que ocurren de novo o son de herencia paterna fue el primer éxito del diagnóstico prenatal no invasivo. Como la mutación no se encuentra en el genoma materno, si se identifica el alelo paterno o la nueva mutación en la sangre materna se confirmaría el diagnóstico definitivo en el feto. ^[7]
- ❖ En esta misma línea, se utilizó para la detección del alelo paterno mutado en enfermedades de **herencia autosómica recesiva** cuando ambos progenitores eran portadores de la enfermedad pero presentaban mutaciones distintas en el mismo gen. La ausencia de esta mutación confirmaba un portador no afecto de la enfermedad o un feto normal. Este método fue utilizado para identificar mutaciones de fibrosis quística o la β-talasemia. El problema surgía cuando la mutación paterna estaba presente ya que no se podía diferenciar si se trataba de un feto afecto o portador, en ese caso se requiere una prueba invasiva para determinar la herencia del alelo materno. ^[7]
- ❖ Las limitaciones del análisis del *cff ADN* eran más notables en enfermedades **autosómicas recesivas** cuando ambos progenitores presentan la misma mutación o en condiciones de **mutación ligada al cromosoma X** ya que requieren la determinación del alelo materno. Esto es complicado debido a los altos niveles de alelos maternos circulante en el plasma de la madre (alelo materno en el ADN libre materno y alelo materno en el ADN libre fetal). Para su determinación requiere la evaluación de las cantidades relativas de los alelos. Esto puede lograrse mediante el uso de la **dosis relativa de la mutación** o *relative mutation dosage* (RMD) que establece la proporción entre gen mutado y gen normal. Cuando los genotipos en el feto y la madre coinciden

se observaron niveles aumentados del alelo mutado lo que implica un genotipo fetal homocigoto para la mutación.^[38]

Analisis basados en haplotipos

Un número cada vez mayor de investigaciones utilizan un análisis basado en haplotipos para determinar la herencia de la mutación. Un haplotipo es una combinación de alelos de un cromosoma que se transmiten juntos genéticamente. A diferencia del RMD que cuantifica la relación entre el gen mutado y el gen normal, el análisis de haplotipo relativo (RHDO) cuantifica la relación entre dos haplotipos en el plasma materno. Esto significa que, en lugar de probar la mutación específica, el análisis busca el haplotipo vinculado a la mutación. La dilucidación del haplotipo fetal se realiza en etapas sucesivas: la primera etapa es averiguar los haplotipos que se heredaron del padre y de la madre y luego se cuantifica la relación que existe en plasma de estos haplotipos. Los resultados de esta técnica han demostrado ser superiores a la de RMD. Su principal ventaja es que el análisis no está restringido por el tipo de mutación y, como se requiere menos secuenciación, es más asequible.^[38] Con este método distintos estudios han logrado diagnosticar la atrofia muscular espinal, hiperplasia adrenal congénita o la enfermedad de Gaucher.



La cuantificación del haplotipo también ha sido utilizada para determinar trastornos ligados al cromosoma X como la distrofia miotónica de Duchenne y la distrofia muscular de Becker para los que no se necesita el conocimiento del haplotipo paterno ya que si el padre tiene la mutación padecerá la enfermedad.

HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X

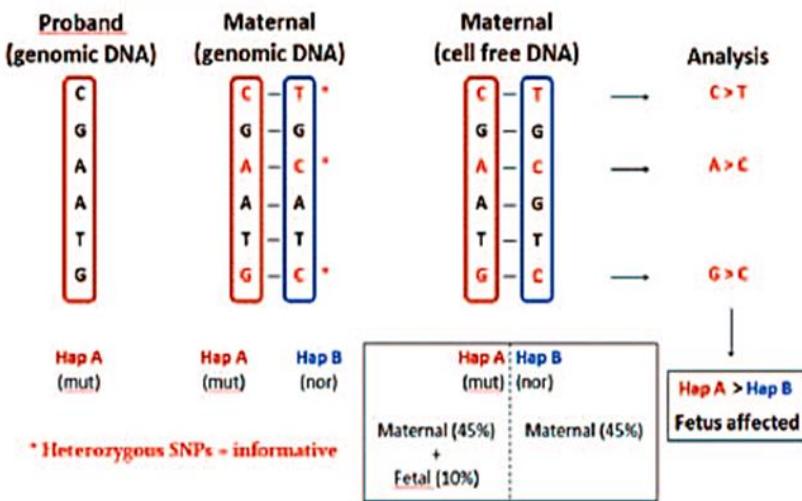


Figura 6. Cuantificación del haplotipo relativo. Se determinan los haplotipos maternos localizando cuál está mutado. En la cuantificación en sangre materna de los haplotipos, si el haplotipo mutado se encuentra en mayor cantidad que el haplotipo normal concluye con que el feto se encuentra afecto. ^[39]

6.1.4. Síndrome De X Frágil

A día de hoy, la causa más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria es el síndrome de X frágil (SXF), por lo que una prueba de cribado prenatal no invasiva es interesante para detectar este trastorno durante el embarazo. Afecta a 1 de cada 4.000 varones y a 1 de cada 6000 mujeres.^[40] Se transmite ligado al cromosoma X, aunque no sigue las leyes de herencia mendeliana. Está causado por una **expansión de repeticiones de trinucleótidos** de citosina-guanina-guanina (CGG) que conlleva una alteración del gen FMR1. La mutación completa se establece cuando hay más de 200 repeticiones de CGG, pero existen un estado de pre-mutación (55 y 200 repeticiones) en el que los pacientes no manifiestan el SXF pero pueden transmitir la mutación a sus descendientes.

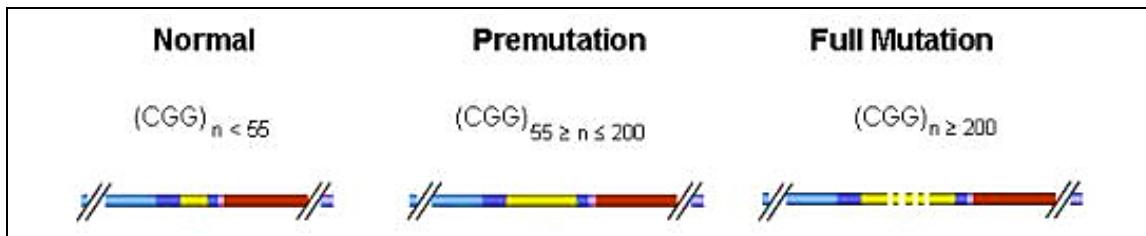


Figura 7. Repeticiones CCG. En individuos no afectos, la repetición varía de 5 a 55, la repetición de premutación es de 55-200 y mutación completa tiene más de 200 repeticiones. Adaptado de Willemse *et al.* ^[41]

Las mutaciones completas únicamente se heredan por vía materna porque sólo las mujeres pueden expandir la repetición de CGG de estado de premutación a mutación completa y es importante destacar que no existen casos esporádicos, siempre que hay un niño afecto, la madre es portadora obligada.^[42] Un estudio sobre prevalencia en Estados Unidos, informó de una frecuencia de estado de portador (más de 54 repeticiones del

trinucleótido CGG) de 1 cada 86 individuos para aquellos con antecedentes familiares de discapacidad intelectual, mientras que para mujeres sin factores de riesgo se estableció en 1 en 257. ^[43]

Sin embargo, a pesar de que los avances del TFNI en la detección de enfermedades monogénicas, existen ciertos problemas técnicos como la gran fragmentación del *cff ADN* que dificulta la detección de algunas mutaciones como las expansiones de trinucleótidos causantes del síndrome de X frágil. Esta limitación, complica, por tanto, su cribado prenatal. ^[39]

Actualmente, el *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG)^[44] recomienda el **diagnóstico preconcepcional** del estado de portador del síndrome de X frágil para aquellas mujeres con antecedentes familiares de síndrome de X frágil o de discapacidad intelectual sugestiva de SXF o de insuficiencia ovárica inexplicable antes de los 40 años. Todos los pacientes a los que se haya identificado la premutación o resultados intermedios deben recibir **asesoramiento genético** para analizar el riesgo para su descendencia de heredar un alelo X con la mutación completa. Además, ACOG también recomienda que se ofrezcan prueba a todas las mujeres que soliciten un examen de portador X frágil después de recibir un apropiado asesoramiento genético.

En cuanto al **diagnóstico prenatal**, el ACOG recomienda directamente el análisis de ADN fetal obtenido de pruebas invasivas (amniocentesis o biopsia corial) a los portadores conocidos de la premutación o de la mutación completa para determinar de manera fiable el número de repeticiones de tripletes. Recomienda también realizar el cribado de estado de portador a aquellos progenitores con antecedentes de SXF que no se hayan realizado un diagnóstico preconcepcional. Todavía es controvertido ofrecer el cribado universal a todas las embarazadas. ^[45]

6.1.5. Secuenciación del exoma fetal para el diagnóstico genético

En un 2-3% de los embarazos, se identifican anomalías fetales estructurales en la ecografía; pero, en la mayoría de los casos no se consigue identificar cuál es el trastorno genético específico que los causa. Por lo que algunos estudios proponen para estos casos secuenciar el exoma completo (WES) con el objetivo de mejorar el diagnóstico prenatal ya que se estima que el 85% de las mutaciones que causan enfermedades se localizan en esta porción del ADN. ^[46] Con esta premisa, diferentes investigaciones han conseguido establecer diversos diagnósticos en fetos con anomalías en la ecografía tales como enfermedad de Milroy, hipofosfatemia o el síndrome de Freeman-Sheldon, entre otros. ^[38]

Por un lado, la secuenciación del exoma durante el periodo prenatal puede suponer una serie de ventajas: establecer un diagnóstico definitivo permite **abordar la enfermedad** con más información tanto en el embarazo como en los cuidados postnatales. También puede facilitar la utilización de **tratamientos dirigidos intraútero** como se ha llevado a cabo en casos de osteogénesis imperfecta. ^[47] Además,

puede tener **implicaciones para futuros embarazos** ya que se podría realizar un diagnóstico preimplantacional. ^[46]

Por otro lado, presenta una serie de desventajas ya que con la secuenciación del exoma completo se pueden identificar defectos genéticos no relacionados con el fenotipo ecográfico fetal. Además de que ofrece una **cobertura incompleta del genoma**, lo que limita la detección únicamente al exoma pudiendo comprometer la interpretación de los resultados.

Por todo ello, en la práctica clínica de rutina, la *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) solo recomienda esta técnica en el diagnóstico prenatal cuando por la historia familiar o el fenotipo ecográfico se sospecha de un trastorno genético y las pruebas genéticas dirigidas no están disponibles o no han establecido un diagnóstico definitivo. Los expertos también sugieren realizar secuenciación de genes diana cuando se sospecha de un síndrome específico. ^[48]

6.2. COMPLICACIONES ASOCIADAS CON EL EMBARAZO

6.2.1. Preeclampsia

Hasta la fecha, no se ha establecido un parámetro definitivo para la predicción del desarrollo de la preeclampsia, por lo que algunas investigaciones se centraron en la detección de ADN fetal en sangre materna. En 1999, Lo *et al.* observó que las gestantes que padecían preeclampsia poseían niveles mayores de *cff ADN* en plasma materno en comparación con aquellas que no lo desarrollaban. Además, estos niveles parecían incrementarse antes del inicio de los síntomas de la enfermedad. En 2009, Illanes *et al.* ^[49] asociaron los niveles aumentados *cff ADN* al comienzo del embarazo con un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino.

Como el ADN libre fetal es difícil de cuantificar por su baja concentración en sangre materna, Rafaeli-Yehuda *et al.* ^[50] decidieron estudiar los cambios en el ADN libre total (materno y fetal conjuntamente) en gestantes con preeclampsia y con trastornos de restricción en el crecimiento fetal. Observaron que la mediana de las concentraciones de ADN total en suero materno era mayor en gestantes con preeclampsia que en embarazos normales o con restricción del crecimiento fetal. (Figura 8).

Por otro lado, Muñoz-Hernández *et al.* ^[51] cuantificaron tanto el ADN total (*cf ADN*) como el ADN fetal libre (*cff ADN*) en suero materno y lo compararon con el grado de severidad de la enfermedad. Observaron una relación gradual entre los niveles de ambos marcadores y el rango de gravedad de la preeclampsia. Sin embargo, sólo los valores de *cf ADN* total pudieron diferenciar entre la preeclampsia grave y el síndrome de HELLP. (Figura 9)

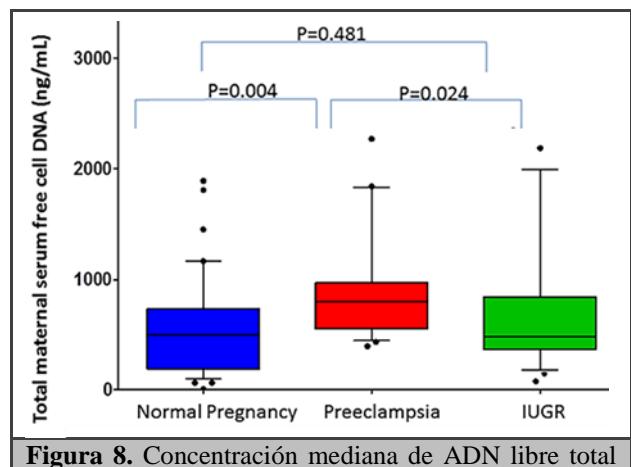
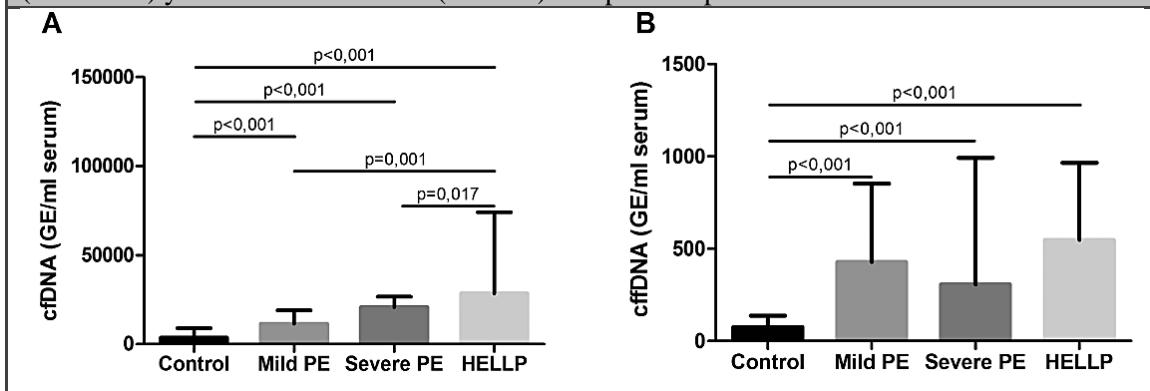


Figura 8. Concentración mediana de ADN libre total (materno y fetal) medido en suero de los grupos a estudio. ^[50]

Figura 9. (A) Medición de ADN total materno en suero. (B) Medición de ADN libre fetal en suero materno en el grupo control (control), preeclampsia leve (mild PE), preeclampsia grave (severe PE) y síndrome de HELLP comparados por medianas.^[51]



Por otra parte, paradójicamente, Rolnik *et al.*^[52] estableció una relación inversa entre la preeclampsia y la fracción fetal de ADN en el plasma materno, es decir, en gestantes con preeclampsia cuantificaron una fracción fetal inferior con respecto al grupo control. Estos resultados, aparentemente discrepantes (baja fracción fetal y un incremento de las cantidades absolutas de *cff ADN*), pueden deberse a un aumento menos pronunciado del ADN libre fetal en comparación con el ADN libre materno, con la consiguiente reducción de la fracción fetal.^[52]

Además, en otra investigación, Rolnik *et al.*^[53] comparó los niveles de fracción fetal con los marcadores utilizados hasta el momento para cribar la preeclampsia en el primer trimestre. Constató que bajos niveles de fracción fetal se asociaban con una mayor presión arterial media y una mayor pulsatibilidad de la arteria uterina, por tanto mayor riesgo de preeclampsia. Mientras que halló una correlación positiva entre fracción fetal y la PAPP-A y el factor de crecimiento placentario. Por lo que concluyó que la fracción fetal baja se relaciona con un mayor riesgo de complicaciones del embarazo, pero su capacidad como marcador independiente requería más investigación.^[53]

Por último, en un reciente metaanálisis de 2017, Contro *et al.*^[54] analizaron la utilidad del análisis de *cff ADN* para predecir el desarrollo de preeclampsia. Dividió los estudios en dos subgrupos: lo que analizaban sólo la preeclampsia precoz (antes de la semana 34 de gestación) y los que estudiaban ‘cualquier preeclampsia’ ya fuera precoz o tardía. De esta manera halló la tasa de falsos positivos que fue del 10% para ambos grupos y la sensibilidad de la prueba para cada grupo (Tabla 11).

Tabla 11. Sensibilidad estimada de la detección de ADN fetal libre para la predicción de preeclampsia para una tasa de falsos positivos del 10%*^[54]

Semanas de gestación*	Preeclampsia precoz	‘Cualquier preeclampsia’
	Sensibilidad	Sensibilidad
11-14 semanas	18%	27,1%
17-28 semanas	68,8%	37,0%

* Semanas de gestación en la que se extrajo la muestra sanguínea materna

Según estos datos, parece que en la actualidad el *cff DNA* no se podría usar como herramienta de predicción para la preeclampsia, ya que la sensibilidad es demasiado baja para ser clínicamente significativa.

6.2.2. Restricción Del Crecimiento Intrauterino

Varias causas se han atribuido al desarrollo de RCIU, pero la disfunción placentaria se considera como una de las más importantes, por ello se ha estudiado su asociación con niveles de *cff ADN* medidos en sangre materna. Sin embargo, los trabajos que estudian esta relación son más limitados que en el caso de la preeclampsia. En 2009, Al Nakib *et al.*^[55] mostraron que los niveles de *cff ADN* eran significativamente superiores en embarazos complicados por RCIU con respecto a los embarazos normales.

Sin embargo, estos resultados contrastan con la investigación de Rafaeli-Yehudai *et al.*^[50] en la que cuantificaron los niveles de ADN total libre (fetal y materno) en sangre materna en gestantes con RCIU y no establecieron diferencias entre el grupo control y el grupo de gestantes que desarrolló RCIU (Figura 8), incluso tampoco se llegó a encontrar diferencias cuando únicamente se analizaron fetos por debajo del percentil 5 o con alteración del Doppler (figura 10).

Por otra parte, Rolnik *et al.*^[53], al igual que en la preeclampsia, constató que la fracción fetal de ADN en sangre materna era inversa al riesgo de padecer RCIU. Es decir, una fracción fetal baja se relacionaba con un aumento del riesgo de padecer un embarazo complicado por restricción del crecimiento fetal antes de la semana 37.

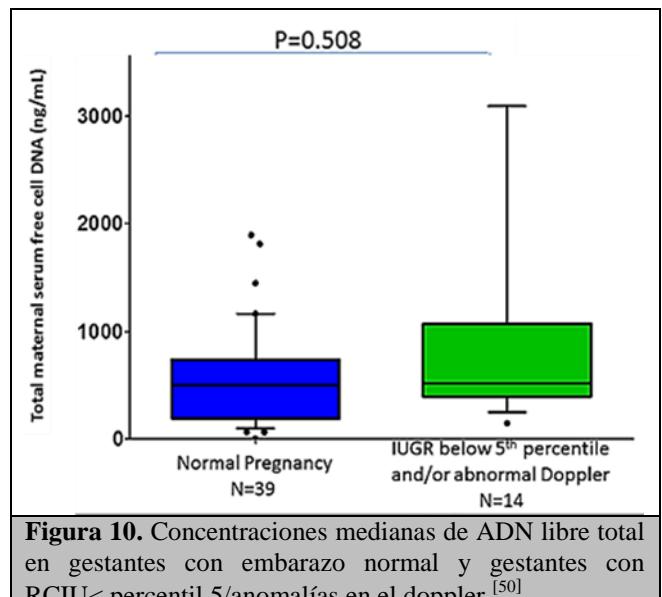


Figura 10. Concentraciones medianas de ADN libre total en gestantes con embarazo normal y gestantes con RCIU< percentil 5/anomalías en el doppler.^[50]

6.2.3. Parto Pretérmino

Actualmente, el riesgo de sufrir un parto prematuro se determina en la semana 11-13 de gestación mediante la combinación de distintos factores como características maternas, historia obstétrica, longitud del cuello uterino y la concentración de α -fetoproteína en suero. Estos marcadores presentan una tasa de detección del 36-55%.^[57]

En 1998, Leung *et al.*^[56] demostró altas concentraciones de *cff ADN* en sangre de gestantes que tuvieron un parto pretérmino, por lo que posteriormente, varios estudios investigaron su utilidad como marcador de este trastorno.

De esta manera, Quezada *et al.*^[57] no observó diferencias significativas entre los niveles de *cff ADN* medidos en plasma materno en las semanas 11- 13 de gestación, entre los diferentes grupos estudiados (parto pretérmino espontáneo de <34 semanas, 34-37 semanas, <37 semanas y embarazos con parto a término). Por lo que concluyó

que los niveles de ADN fetal medidos en el primer trimestre no predicen el parto pretérmino y que el aumento observado de los niveles de *cff ADN* en los trabajos previos parecían ser parte del proceso que inicia el trabajo de parto.

La cuantificación de *cff ADN* en momentos más avanzados de la gestación ha proporcionado otras hipótesis. Dugoff *et al.*^[58] compararon la fracción fetal de gestantes durante las semana 11-14 de gestación y durante las semanas 14-20. Únicamente en el segundo grupo observó una asociación significativa entre las concentraciones de *cff ADN* y la probabilidad de desarrollar un parto pretérmino. Además, calcularon la sensibilidad y la especificidad de esta prueba en aquellas pacientes que presentaban una fracción fetal por encima del percentil 95. (Tabla 12)

Tabla 12. Características del rendimiento en pacientes con una fracción fetal por encima del percentil 95 medido en las semanas 14-20 de gestación . Adaptado de Dugoff *et al.*^[58]

	Sensibilidad	Especificidad
Parto pretérmino <34 semanas	33,3 % (11,8 – 61,6)	95,8 (92,9 – 97,8)
Parto pretérmino <37 semanas	15,6 % (5,3 – 32,8)	95,6 (92,5 – 97,6)

6.3. APPLICACIONES EN ONCOLOGÍA GINECOLÓGICA

6.3.1. CÁNCER DE MAMA

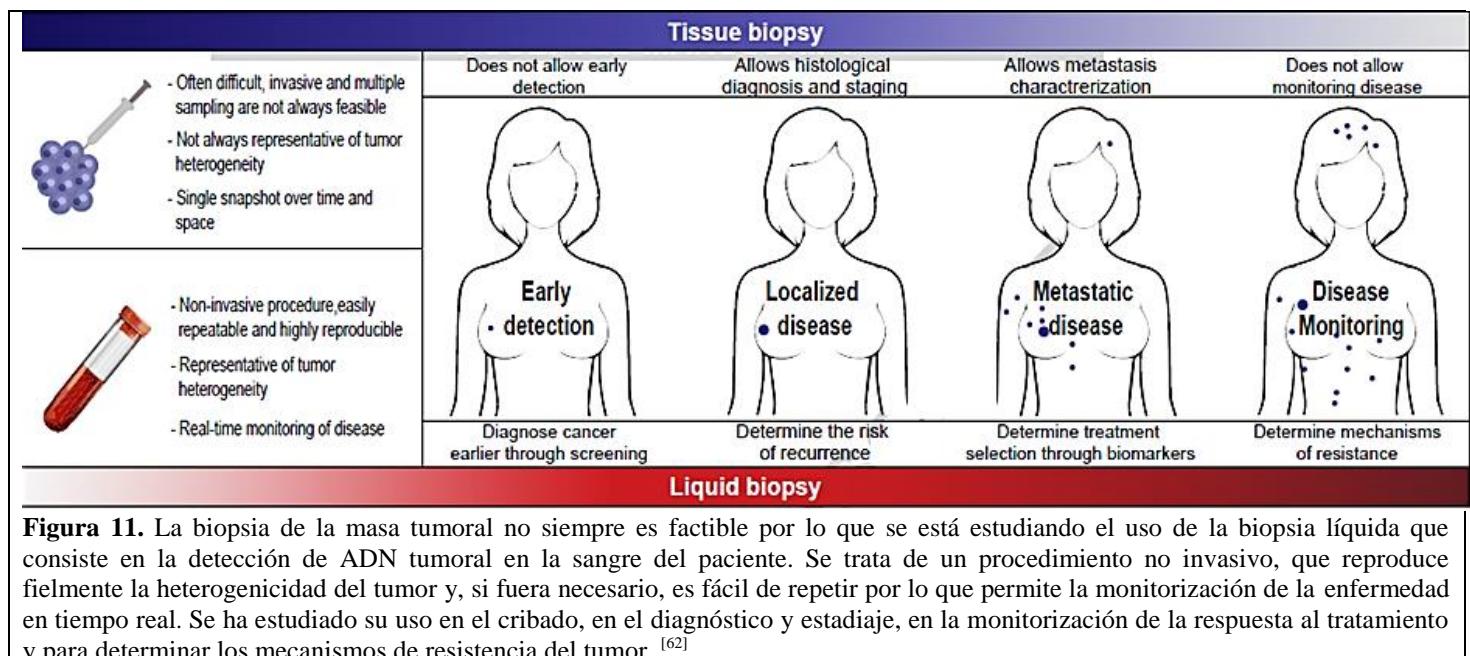
El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres occidentales y representa una agrupación heterogénea de enfermedades con diferentes características y resultados clínicos. La detección de ADN tumoral circulante (*ct ADN*) no ha sido implementada de manera rutinaria en la práctica clínica del cáncer de mama, pero parece ser enfoque prometedor para medicina personalizada.

6.3.1.1. Cribado y diagnóstico

En las etapas iniciales de la enfermedad, como el tumor está limitado a la mama, los niveles de *ctADN* en sangre están presentes en bajas concentraciones, por lo que su detección es difícil. Además, es probable que la biopsia del tumor sólido siga siendo la primera opción prioritaria para el análisis del tumor en fases tempranas del cáncer ya que el tejido mamario, a menudo, es accesible a las biopsias percutáneas.

Beaver *et al.*^[59] estudiaron el *ctADN* en fases tempranas del cáncer de mama mediante la detección del **gen de PIK3CA** que muta con frecuencia en esta enfermedad y se estimó una concordancia del 93% en pacientes que previamente se había localizado dicha mutación en la masa tumoral. Del mismo modo, Bidard *et al.*^[60] estudiaron la mutación en **TP53**, a menudo relacionada con los cánceres BRCA1. Concluyó que la mutación podría ser utilizada como prueba diagnóstica para pacientes con cáncer de mama con BRCA1 mutado y también para determinar la recaída del cáncer (mutación de TP53 idéntica) o se trata de un nuevo cáncer relacionado (mutación de TP53 diferente).

La prueba de detección de *ctADN* se ha sugerido utilizarla en individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer como podría ser pacientes con BRCA mutado o con genes relacionados con el síndrome de Lynch. Aunque no se han realizado investigaciones específicas con este tipo de pacientes, Kammesheidt *et al.*^[61] estudió el *ctADN*, con un panel de 96 mutaciones, en 1059 individuos considerados de alto riesgo de padecer diferentes cánceres (entre ellos mutación en BRCA o con predisposición al síndrome de Lynch). Sin embargo, sus resultados mostraron una alta tasa de falsos positivos limitando el valor de *ctADN* en la detección precoz.



6.3.1.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento

Como indicador de **enfermedad residual** tras cirugía curativa, fue estudiado por García-Murillas *et al.*^[64] quienes detectaron una mutación en la masa tumoral en al menos el 78% de los pacientes y, posteriormente fue rastreada en el plasma en momentos distintos de la enfermedad: al inicio del estudio, después de la cirugía y a los 6 meses de seguimiento. Al inicio del estudio, esta mutación se detectó en el 69% de las muestras de plasma y se volvió a detectar al cabo de 13,6 meses de mediana tras la operación indicando enfermedad residual tras el tratamiento.

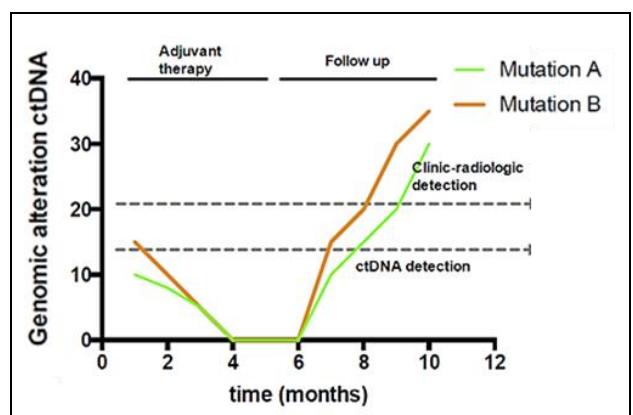


Figura 12. Papel del ADN tumoral circulante (*ctDNA*) en cáncer de mama: Detección de enfermedad residual.^[63]

En la **enfermedad metastásica**, la concentración de *ctADN* tiende a ser mayor que en etapas incipientes del cáncer, lo que facilita su detección. De esta manera, se ha investigado para detectar metástasis antes de la aparición de síntomas clínicos o imágenes. Beaver *et al.*^[59] detectó en plasma reordenamientos cromosómicos 11 meses antes de la aparición clínica de la metástasis.

El análisis de *ctADN* permite identificar la **heterogeniedad molecular** en las metástasis, importante para evaluar con precisión **terapias dirigidas**. En este contexto, es de interés el cáncer de mama triple negativo ya que no tiene dianas terapéuticas definidas. En estos pacientes, se han intentado identificar objetivos que se puedan rastrear mediante *ctADN* como por ejemplo el receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) que participa en la regulación de la supervivencia celular, proliferación, migración y diferenciación. Estas mutaciones son raras (<1%), pero se ha observado que en tumores triple negativos son más comunes, por lo que actualmente, se están estudiando la eficacia de fármacos inhibidores de FGFR. ^[65]

Además, se están intentando reconocer en *ctADN* alteraciones responsables de la progresión y resistencia del cáncer como **HER2** y **HER3** o de la vía de señalización **PI3K/ AKT/mTOR** que puedan ser objeto de dianas terapéuticas y sirvan de **guías de terapia personalizada** (figura 13). ^[65]

6.3.1.3. Pronóstico

Actualmente, el pronóstico se estima mediante pruebas de imagen y determinación de antígenos contra el cáncer (por ejemplo, el CA 15-3); sin embargo, su sensibilidad se estima solo en un 60-70%. ^[65] Por ello, Bidard *et al.* ^[60] decidió el valor pronóstico de *ctADN* utilizando la mutación de TP53 como marcador pero no encontró correlación entre los niveles de *ctADN* y la supervivencia general.

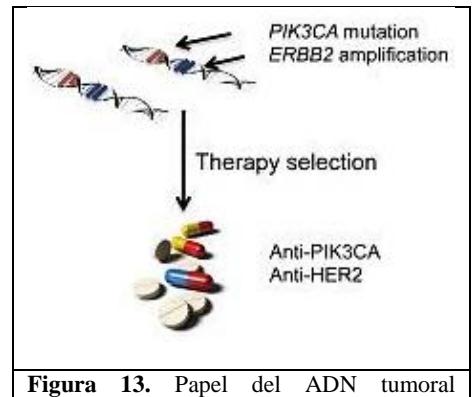


Figura 13. Papel del ADN tumoral circulante (*ctDNA*) en cáncer de mama: Estratificación genómica de los pacientes. ^[68]

6.3.2. CÁNCER DE OVARIO

Según la OMS, el cáncer de ovario es el séptimo más común del mundo y la quinta causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres. ^[59] Esto es debido a la ausencia de síntomas específicos y a la falta de métodos eficaces de detección, la mayoría se diagnostican en una etapa avanzada en las que la quimioterapia y la cirugía no son curativas. Por ello se decidió estudiar las aplicaciones potenciales del ADN circulante tumoral en este campo.

6.3.2.1. Cribado y diagnóstico.

Se han propuesto y estudiado distintas alteraciones genómicas del ADN tumoral circulante para establecer el diagnóstico del cáncer de ovario.

- ❖ En primer lugar, se evaluaron los **niveles totales de ADN libre**, es decir se cuantificó conjuntamente los niveles de ADN libre normal y del ADN tumoral circulante. Encontraron niveles significativamente superiores en pacientes con cáncer de ovario en comparación con pacientes sanas o con enfermedades ováricas benignas. ^[59] El meta-análisis de 2016 de Zhou *et al.* ^[66] analizaron datos de nueve estudios para evaluar el uso de ADN libre total (*cfADN*) como biomarcador para el diagnóstico de cáncer de ovario. Determinaron una sensibilidad y una especificidad

de 70% y 90% respectivamente lo que muestra que la precisión diagnóstica de la prueba tiene una sensibilidad insatisfactoria pero una especificidad aceptable. Además, al evaluar la correlación entre los niveles totales de *cf ADN* y las características clínico-patológicas, se comprobó que los pacientes con tumores en estadio I-II presentaban niveles más bajos de *cf ADN* en comparación con los pacientes en estadios más avanzados.^[59]

- ❖ Más adelante, se investigaron **alteraciones específicas del tumor** en el plasma. Por ejemplo, se encontraron mutaciones de **TP53** detectables en plasma y se comprobó que la tasa de detección de esta mutación aumentaba en los pacientes con enfermedad avanzada y se volvía indetectable en pacientes tras cirugía, por lo que obtuvieron una tasa de concordancia entre el tumor y el ADN plasmático.^[59]
- ❖ También se identificaron **alteraciones en el reordenamiento de los cromosomas o la inestabilidad cromosómica** Recientemente, Vanderstichele *et al.*^[67] observaron que en pacientes con cáncer de ovario la inestabilidad cromosómica detecta por métodos WGS era significativamente superior que en pacientes sanas o con enfermedad benigna con una sensibilidad y especificidad mayor que el marcador tumoral CA 125.^[67]
- ❖ También se ha propuesto el uso de **alteraciones epigenéticas** para detectar *ctADN* como la hipermetilación de algunas secuencias sugiere tener también una especificidad del tumor.^[59]

6.3.2.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento

Aunque el cáncer de ovario es sensible a la quimioterapia y muchas pacientes responden al tratamiento inicial, la mayoría desarrollan recurrencia de la enfermedad. El principal factor de recurrencia es por la aparición de resistencias en las células tumorales por lo que el *ctADN* puede desempeñar un papel relevante en la monitorización del cáncer.^[59]

- ❖ Por un lado, la cuantificación de los **niveles totales de ADN libre** (*cf ADN*) revelaban la respuesta al tratamiento. Aunque al principio se constató un aumento inicial de la concentración de ADN libre relacionada con la apoptosis de las células tumorales, posteriormente se constató un descenso de los niveles de *cf ADN*: en el tercer día post-tratamiento eran un 20% más bajos y un 83% en el décimo día.^[59]
- ❖ También se examinaron mutaciones específicas del tumor para valorar la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, se ha asociado la **reversión de mutaciones de BRCA1 y BRCA2** con la resistencia a tratamiento con quimioterapia. Por lo que Weigelt *et al.*^[68] estudiaron esta reversión en pacientes con cáncer de ovario resistentes al platino. En el 21% de ellas, identificó en el análisis del ADN tumoral circulante una reversión de las mutaciones de BRCA1 y 2 lo que permitió cambiar el tratamiento en estas pacientes y administrarles otro de acuerdo con su perfil molecular.

6.3.2.3. Pronóstico.

Teniendo en cuenta únicamente la cuantificación de los **niveles totales de ADN libre**.

- Se objetivó que aquellas pacientes con cáncer de ovario que presentaban niveles más altos de *cf ADN* antes de la cirugía, presentaban una supervivencia media

inferior y un riesgo de muerte 2.38 superior en comparación con las mujeres con concentraciones menores de *cf ADN*.^[69]

- En cuanto a las pacientes que recibieron quimioterapia, niveles más altos de *cf ADN* antes del tratamiento se asociaron con un alto riesgo de recaída de la enfermedad y de metástasis. Además, después de la quimioterapia, los niveles más altos también se asociaron con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad y una supervivencia a los cinco años menor.^[69]

Las investigaciones que estudiaron **alteraciones específicas del tumor** detectaron que:

- Un menor número de copias del gen RAB25 antes de la cirugía se asociaba con un mayor riesgo de muerte por cáncer de ovario.^[67]
- La detección de mutaciones TP53 o KRAS en plasma, se relacionaba con una disminución de la supervivencia. En pacientes con la mutación la supervivencia media era de 21-28 meses, mientras que las pacientes en las que no se detectó en plasma la mutación, presentaban una supervivencia media de 54-58 meses.^[67]

Por lo que los niveles indetectables de mutaciones específicas en muestras de suero obtenidas después de la quimioterapia se asociaron con una mayor supervivencia libre de progresión del tumor.^[67]

6.3.3. CÁNCER DE ENDOMETRIO

Según la SEGO, el cáncer de endometrio es el tumor maligno más frecuente del tracto genital femenino en España y el segundo en mortalidad, tras el cáncer de ovario. Se han llevado a cabo muy pocos estudios que evalúen el contenido y utilidad del ADN libre tumoral (*ct ADN*) en el cáncer de endometrio

6.3.3.1. Cribado y diagnóstico

Se descubrió que las **concentraciones totales de ADN libre** tendían a ser mayores en pacientes con cáncer de endometrio con respecto a personas sanas o pacientes con patologías benignas. Pero no se halló correlación con el estadio o con el grado histológico^[70] Mientras que otro grupo de investigación afirmó que la cuantificación de los niveles de *cf ADN* no era útil para el cribado de este tipo de cáncer, pero sugirió que los cambios en los niveles de ADN libre tumoral en un paciente determinado antes y después de la cirugía, o del tratamiento farmacológico, podía ser un marcador pronóstico.^[70]

Cicchillitti *et al.*^[71] evaluaron el contenido de ADN libre total (*cf ADN*) en 59 mujeres con cáncer de endometrio. En primer lugar, detectaron concentraciones mayores de *cf ADN* en pacientes con hiperplasia atípica de endometrio y con cáncer de endometrio en comparación con el grupo control de pacientes sanas o con patología benigna de endometrio. Además, estos niveles aumentaban significativamente en cánceres de grado 2 y 3 con respecto a los tumores de grado 1. No obstante, a través de este análisis, no se encontró ninguna asociación entre concentraciones específicas de *cf ADN* y la etapa concreta del cáncer de cada paciente. (Figura 14)

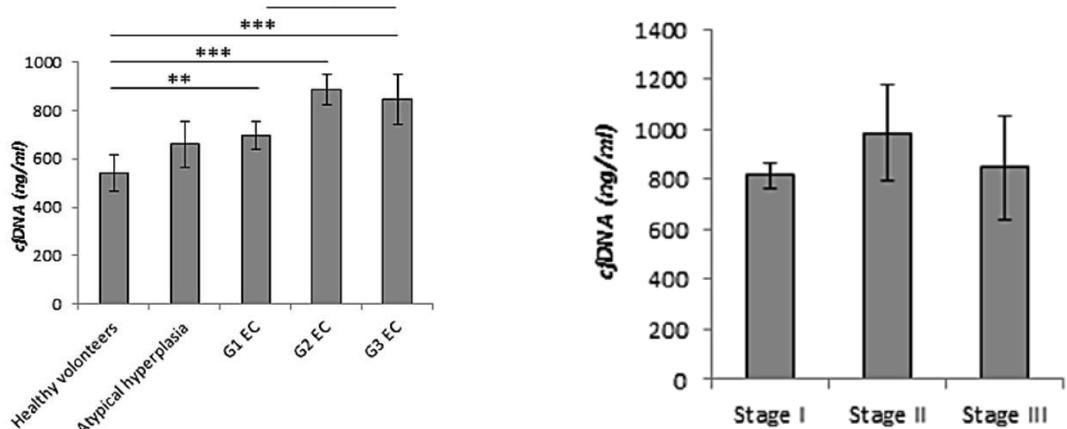


Figura 14. (A) Comparación de los niveles de *cf ADN* entre voluntarios sanos, pacientes con hiperplasia atípica y con cáncer de endometrio G1, G2 y G3. (B) Media de los niveles detectados en plasma de *cf ADN* según el estadio de cáncer de endometrio.^[71]

Estos niveles fueron comparados con características clínicas de las pacientes como el índice de masa corporal y la hipertensión. Se detectó un aumento significativo de la cantidad total de *cf ADN* en pacientes con un IMC ≥ 30 , sin embargo esta elevación no se correlacionó con el grado o estadio del cáncer. En cambio, sí que se detectó un aumento significativo de *cf ADN* en pacientes hipertensas con grado 2 y 3 del cáncer, lo que sugiere una correlación entre los niveles de *cf ADN* y la hipertensión en cánceres de endometrio más agresivos.^[71]

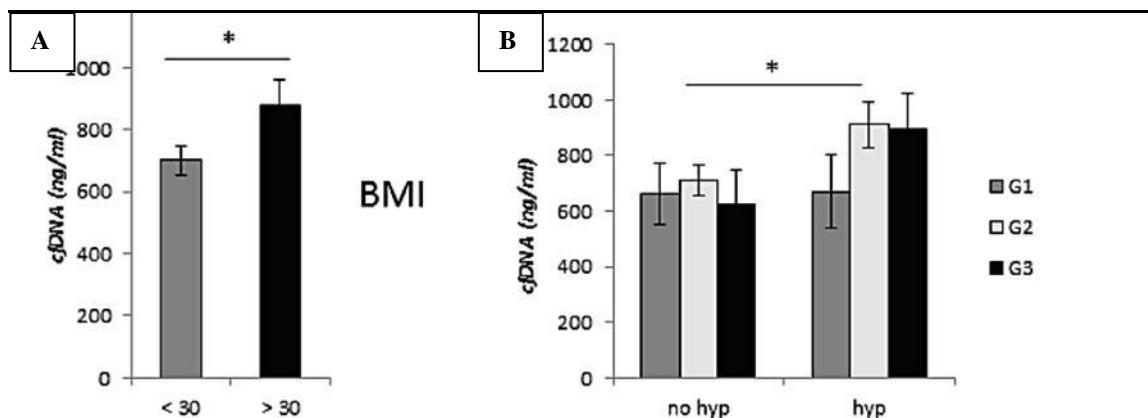


Figura 15. (A) Asociación entre los niveles de *cf ADN* y el índice de masa corporal < 30 y > 30 . (B) Correlación entre los niveles de *cf ADN* en plasma en pacientes hipertensos y no hipertensos según el grado de cáncer de endometrio (G1, G2, G3).^[71]

En cuanto a la detección de **alteraciones específicas** del *ct ADN* endometrial. Un estudio pionero diseñó una investigación para determinar si mutaciones asociadas al cáncer de endometrio podrían ser detectadas en el ADN libre de estas pacientes. Establecieron que aproximadamente el 90% de los carcinomas endometrioides tienen al menos una mutación en los genes CTNNB1, KRAS, PTEN o PIK3CA y comprobaron que la presencia de estas mutaciones en plasma se asociaba con fases avanzadas del cáncer, invasión miometrial profunda, linfática o vascular. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios para establecer esta prueba como rutina en la práctica clínica.^[72]

6.3.3.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento

Pereira *et al.*^[73] identificaron mutaciones específicas del tumor de cada paciente. Así establecieron **biomarcadores personalizados para cada paciente** que fueron determinados y cuantificados en el plasma del paciente con la detección de *ctADN*. De esta manera, consiguieron demostrar la presencia de tumor residual tras tratamiento y consiguieron predecir la respuesta al tratamiento de una manera más dinámica que los estudios de imagen o los marcadores tumorales utilizados actualmente.

6.3.3.3. Pronóstico

Pereira *et al.*^[73] también establecieron que el *ctADN* podía ser un factor predictor independiente tanto de la progresión libre de enfermedad como de la supervivencia general de los pacientes. Al igual que Cicchilliti *et al.*^[71] que concluyeron que la evaluación de los niveles de totales de *cfADN* en suero obtenidos antes del tratamiento quirúrgico pueden ayudar a establecer el pronóstico del cáncer de endometrio.

6.3.4. CÁNCER DE CÉRVIX

A pesar de los grandes avances en la detección precoz, el cáncer de cérvix es la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres y se estima que la tasa de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente el 70%. Dado que las pruebas de Papanicolaou y detección del VPH son muy poco sensibles para **detectar la enfermedad metastásica y recurrente**, existe la necesidad de una prueba mínimamente invasiva para la monitorización de esta enfermedad.

6.3.4.1. Cribado y diagnóstico

Jeannot *et al.*^[74] analizaron el plasma de 70 pacientes en el momento en el que se les diagnosticaron carcinomas causados por el virus del papiloma humana (VPH) genotipo 16 o 18 ya fueran carcinomas de cérvix, del canal anal u orofaríngeos. En estos pacientes se aisló ADN libre total y se realizó una PCR identificando la **secuencia genética del VPH**. El ADN del virus se puso de manifiesto en 87% de las muestras con carcinoma invasivo pero no se detectaron en aquellas pacientes con neoplasia intraepitelial de cérvix de alto grado. Además, la evaluación cuantitativa mostró que los niveles detectados de ADN viral circulante estaban en relación con el estado clínico y el tamaño del tumor.^[74]

En un reciente estudio, se recogieron muestras de suero de pacientes con carcinoma de cérvix y se analizó el *ct ADN* buscando **mutaciones somáticas** en 50 genes que pudieran determinar el cáncer de cérvix. En el 84% de los pacientes se encontró alguna alteración en esos genes, el más común fue TP53 en el 52.3% de los pacientes y que al combinar las alteraciones de los genes *BRAF*, *CDKN2A*, *EGFR*, *PIK3CA*, *PTEN*, *STK11*, *TP53* y *VHL*, se encontró al menos una de las alteraciones genéticas en el 100% de los pacientes.^[75]

6.3.4.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento

Kang *et al.*^[76] también midieron y cuantificaron los niveles de *ctADN* con la secuencia del VPH en pacientes con cáncer de cérvix metastásico. Este *ctADN* fue detectado en todos los enfermos y en ninguno de los voluntarios sanos. Además, también se identificó correctamente el genotipo del VPH en las muestras de suero. Por lo que exploraron la viabilidad de este método como marcador para el **seguimiento de pacientes** sometidos a immunoterapia y que habían tenido una regresión completa del cáncer. Se les realizaron extracciones de suero secuenciales y se detectó un pico transitorio a los 2-3 días tras el tratamiento y, posteriormente, un aclaramiento persistente del *cfADN* de VPH.

6.3.4.3. Pronóstico

En una reciente investigación realizada por Cheung *et al.*^[77] estudiaron la cuantificación de *ctADN* en plasma mediante la identificación de la secuencia de VPH como marcador pronóstico. Concluyeron que las altas concentraciones de la secuencia de VPH en plasma era un factor de riesgo para la recurrencia de la enfermedad a los 5 años de seguimiento.

7. DISCUSIÓN

Tras la implantación en la práctica clínica de la detección de ADN fetal (*cff* ADN) como método no invasivo de cribado para la trisomía 21, ha habido un interés creciente en la detección del ADN libre fetal para otros trastornos. En los últimos años, el alcance del *cff* ADN se ha ampliado sustancialmente, ya que no sólo incluye las aneuploidías típicas (trisomía 21, 18 y 13) sino que también es capaz de detectar aneuploidías de los cromosomas sexuales, microdeleciones o microduplicaciones específicas, variantes monogénicas o trisomías autosómicas raras. Todo el ADN fetal se encuentra presente en el plasma materno, a pesar de su alto grado de fragmentación. Esto implica que, a priori, cualquier defecto genético puede ser estudiado en el ADN libre fetal presente en sangre materna. Sin embargo, tener la capacidad técnica para detectar una de estas condiciones no implica, necesariamente, un beneficio clínico para la población o para las gestantes. Por ello, antes de la implementación de esta prueba de cribado en la práctica clínica habitual es necesario evaluar cuidadosamente los riesgos y beneficios de los programas de detección de cada una de las condiciones.

Según la OMS, para que una prueba de cribado se considere apropiada han de cumplirse una serie de criterios:^[78]

- La enfermedad debe ser relativamente prevalente en la población.
- La enfermedad debe ser un problema importante de salud, es decir, debe ser causa de morbilidad y/o mortalidad significativa.
- Deben estar disponibles pruebas para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.
- La prueba debe ser apropiada para identificar la enfermedad con una fiabilidad medida en términos de sensibilidad y especificidad. De fácil acceso, aplicación simple y aceptable para la población.
- El coste (incluido el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes diagnosticados) debe ser proporcional al beneficio obtenido.

Recomendaciones del cribado de anomalías genéticas

En el caso de los **aneuploidías de los cromosomas sexuales**, el TFNI ha mostrado una menor precisión y mayor tasa de fracaso que el cribado para la trisomía 21, particularmente en la monosomía X, por lo que su rendimiento como prueba de cribado es dudosa. Además, muchas de las anomalías de los cromosomas sexuales no son de gran relevancia clínica, sino que son casos leves sin discapacidad intelectual que se diagnostican en la edad adulta por infertilidad. Si bien es cierto que un diagnóstico precoz de estos trastornos permite intervenciones terapéuticas tempranas tras el nacimiento, por ejemplo inicio de terapia hormonal en el síndrome de Turner o de Klinefelter. Dado que la sensibilidad de la prueba se acercan o superan el 90%, ciertos laboratorios la ofrecen hoy en día. La *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) recomienda, como parte del asesoramiento prenatal, informar a las pacientes de la disponibilidad de esta prueba de cribado y advertir de la alta probabilidad de un resultado “falso positivo”. Además, insiste en que los profesionales

sanitarios “deben disuadir a las pacientes de realizarse este cribado con el único propósito de identificar el sexo biológico del feto”.^[79]

Con respecto a los **síndromes de microdeleción o microduplicación**, como son trastornos con una prevalencia muy baja, el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba de cribado también es baja, a pesar de a pesar de la sensibilidad aceptable mostrada en los estudios.^[31] De tal forma que si este test se aplica a población de bajo riesgo un resultado positivo del TFNI requerirá una prueba diagnóstica para confirmarlo, lo que invalidaría uno de los beneficios más convincentes por el que se implantó el test fetal no invasivo (TFNI) que era la reducción significativa de la realización de pruebas invasivas.

En estos síndromes es difícil establecer qué población se considera de alto riesgo, ya que no se ha encontrado relación con la edad materna ni con el cribado combinado.^[29] Considerando gestantes de alto riesgo aquellas con anomalías detectadas por ultrasonido o con antecedentes de un feto afecto por uno de estos trastornos, la prueba de detección del ADN libre fetal no cambia el manejo del embarazo. Es decir, si la prueba de *cff ADN* es positiva se necesitará confirmar el diagnóstico mediante el uso de pruebas invasivas, mientras que si el resultado es negativo se tendrá que ofrecer igualmente una prueba de diagnóstico para confirmar los hallazgos de la ecografía. En resumen, en gestantes de alto riesgo, independientemente del resultado de la prueba, está indicada una prueba invasiva, por lo que realizar el TFNI únicamente aumenta el coste y retrasa el diagnóstico.^[80]

De hecho, en la mayoría de las guías de las organizaciones profesionales no respaldan ofrecer el TFNI para estos trastornos:

- La *American College of Obstetrics and Gynecology* (ACOG) recomienda que “el cribado de rutina mediante *cff ADN* para los síndromes de microdeleción no se deben realizar”.^[81]
- Además, la *American Society of Human Genetic* (ASHG) y la *European Society of Human Genetics* (ESHG) coinciden con que “no se recomiendan actualmente” y abogan por “una extensión de las indicaciones del TFNI prudente sobre todo a trastornos congénitos graves, una vez que se haya realizado estudios sólidos de validación y una evaluación exhaustiva de todos los aspectos relevantes”.^[82]
- La *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) “no recomienda el test para detectar cambios en el número de copias de todo el genoma fetal”. Aunque los autores también afirman que “si se desea conocer esta información, se recomiendan pruebas de diagnóstico”.^[82]
- Por el contrario, la *International Society of Prenatal Diagnosis* (ISPD) no se opone específicamente al cribado, señala que “las pruebas deberían limitarse a trastornos clínicamente significativos con un fenotipo grave bien definido”.^[83]

En cuanto al cribado de las **enfermedades monogénicas** se han conseguido grandes avances gracias a la aplicación de nuevas técnicas en el análisis de ADN como los basados en el haplotipo. Sin embargo, la ACOG no recomienda el cribado de estos

trastornos en la población general ya que aún no se tienen datos suficientes como para proporcionar información sobre la precisión de la prueba de cribado.^[84]

Asesoramiento en el diagnóstico prenatal

Uno de los aspectos importantes de las pruebas de cribado es la necesidad de asesorar a los progenitores antes y después de la realización de la prueba de cribado para que comprendan las implicaciones de este test y puedan tomar decisiones de manera autónoma al respecto.

Al ampliar el alcance del cribado, el **consejo pre-test** se vuelve indispensable. En primer lugar, consejo pre-test debe ser informado por un profesional capacitado con experiencia en genética. Se debe advertir que la detección de *cff ADN* en sangre materna es únicamente una prueba de cribado y, como tal, únicamente proporciona una estimación del riesgo de tener un feto afecto con las enfermedades cribadas.^[30]

También debe informar sobre la naturaleza de las alteraciones cribadas y sobre la tasa de detección y de fracaso de la prueba para cada una de ellas. Además, los padres también deben conocer los procedimientos a seguir en el caso de que la prueba de cribado resulte positiva como la realización de pruebas invasivas para confirmar el diagnóstico o de ecografías complementarias o de ampliar el estudio de la enfermedad después del nacimiento. Así mismo, también es importante indicar que existe la posibilidad de identificar un hallazgo secundario o incidental, no relacionado con la indicación de la prueba, del que no se conoce su significado clínico. Así como detectar posibles trastornos maternos no diagnosticados hasta el momento como neoplasias.^[30]

Tras la prueba de cribado, también es necesario asesoramiento por parte del profesional sanitario para interpretar los resultados del cribado y explicar a los padres las implicaciones de estos resultados. De esta manera, la pareja podrá decidir de manera autónoma si quiere proseguir con pruebas invasivas para establecer el diagnóstico o prefiere no hacerlo. Pero también puede tomar una decisión reproductiva sobre si desea continuar con el embarazo o interrumpirlo.

Aspectos éticos

Un aspecto importante del uso del análisis del ADN fetal en sangre materna son los dilemas éticos que pueden surgir como consecuencia de esta prueba. Este análisis requiere el consentimiento de las pacientes y se debe garantizar que la información genética del feto y de los padres se mantenga confidencial.

Es importante destacar que el cribado prenatal de anomalías fetales va dirigido a permitir que las gestantes y sus parejas tengan elección reproductiva autónoma para que, en el caso de un diagnóstico adverso, tengan la posibilidad de interrumpir el embarazo. Es un tema delicado que los profesionales deben saber abordar y respetar de acuerdo al principio ético de autonomía del paciente.

Además, el análisis del ADN fetal es capaz de determinar el sexo del feto desde semanas tempranas del embarazo. Esto es algo que crea un conflicto ético, ya que se teme que se pueda recurrir a este test para interrumpir el embarazo en el caso de que el sexo no sea el deseado por los padres.

Coste de la determinación del ADN libre

Otro de los aspectos importantes del cribado es la evaluación económica; de hecho, la OMS lo señala como uno de los criterios para establecer las pruebas de cribado. El coste de las pruebas de detección de *cff ADN* ha supuesto una de las principales limitaciones de esta prueba de cribado ya que son más caras que las pruebas de cribado combinado convencionales. Además, los costes totales del TFNI dependen de la complejidad de las técnicas de análisis y procesamiento del ADN. Por ejemplo, en aquellos métodos más sensibles como el análisis del haplotipo o la secuenciación completa del genoma o exoma el coste es mayor.^[39]

En el caso concreto de la detección de las aneuploidías cromosómicas típicas (cromosoma 21, 13 y 18) esta prueba podría considerarse coste-efectiva si tenemos en cuenta la disminución de procedimientos invasivos necesarios y de los riesgos gestacionales asociados. Sin embargo, en la detección del resto de trastornos tenemos que tener en cuenta dos aspectos; primero, para detectar las anomalías genéticas son necesarias técnicas mucho más sensibles para analizar el *cff ADN* que son muchos más caras; segundo, las tasas de detección no son muy altas por lo que pueden crearnos dudas diagnósticas lo que no evitaría la realización de pruebas diagnósticas invasivas. Por lo que los costes totales del TFNI pueden superar a los de las pruebas invasivas. Por lo tanto es necesario realizar análisis de coste-efectividad y rentabilidad para determinar la eficacia clínica real de esta prueba.

Uso de la biopsia líquida en las complicaciones del embarazo

Se ha constatado que altos niveles de ADN libre fetal se pueden correlacionar con trastornos placentarios como la preeclampsia; sin embargo en la restricción del crecimiento intrauterino no se han encontrado relación. Sin embargo, a pesar de encontrar una relación, actualmente no se podría utilizar el *cff ADN* como marcador independiente de preeclampsia ya que las tasas de sensibilidad de la prueba no son clínicamente significativas.

Uso de la biopsia líquida en el campo de la oncología

Con respecto al **campo de la oncología**, los estudios llevados a cabo en los cánceres ginecológicos únicamente informan del posible **uso potencial** de esta técnica, para poder llevar a la práctica clínica esta prueba es necesario optimizar y estandarizar las estrategias de análisis actuales. Además es necesario mejorar nuestra comprensión sobre el origen y las características del ADN libre tanto materno como tumoral para interpretar las asociaciones entre los cambios del *cff ADN* y las manifestaciones clínicas del cáncer.

En comparación con el diagnóstico prenatal, el desarrollo de la biopsia líquida en el uso de la práctica clínica está siendo difícil y se está demorando por varios factores. En primer lugar, el cáncer es un proceso patológico y complejo, una enfermedad dinámica y heterogénea con múltiples variables más complicadas de analizar. Por otro lado, la disponibilidad del ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer es también muy variable, incluso entre pacientes con el mismo estadio de la

enfermedad, a diferencia del ADN libre fetal que es relativamente alto y constante a partir de, aproximadamente, la 9^a semana de gestación. En consecuencia, es más difícil estandarizar la prueba para el diagnóstico, tratamiento y monitorización de los pacientes con cáncer.

De los estudios analizados para los diferentes cánceres, obtuvieron mejores resultados aquellos que utilizaban **alteraciones específicas** del ADN tumoral como mutaciones genéticas o epigenéticas, que aquellos que medían únicamente los niveles totales de ADN (ADN plasmático y tumoral). Posiblemente sea debido a que las alteraciones genéticas son más específicas del tumor, mientras que los niveles totales de ADN libre pueden verse incrementados por causas benignas propias de la madre como estados inflamatorios o estrés.

Con respecto a la correlación entre los hallazgos de la biopsia del tumor sólido y la biopsia líquida, se observaron mejores resultados cuando se utilizaron **técnicas más sensibles**, como la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing). No obstante, debemos tener en cuenta que estas pruebas se aplicaron sobre pacientes con cánceres ginecológicos por lo que las sensibilidades y especificidades observadas no tienen por qué aplicarse a la población general.

La caracterización molecular de los tumores es particularmente interesante con la aparición de **terapias dirigidas**, principalmente cuando no se dispone de una muestra de tumor o la biopsia no es viable. Por lo que el análisis de *ct* ADN puede ser una buena estrategia para mejorar el manejo del cáncer.

Perspectivas de futuro

Los continuos avances en la bioquímica y en la biología molecular proporcionan técnicas de análisis y secuenciación del ADN cada vez más sensibles y más económicas que permitirán detectar anomalías genéticas cada vez más pequeñas. Por lo que una de las perspectivas de futuro es la implementación de la **terapia génica** para estos trastornos. Se están estudiando genes represores que puedan inactivar la copia extra del cromosoma 21 o del cromosoma X para las aneuploidías de los cromosomas sexuales.^[85] O por ejemplo, actualmente están investigando en ratones la forma de tratar la enfermedad de Gaucher.^[86] Sin embargo, todavía son necesarios muchos estudios para poder llevar estas investigaciones a la práctica médica.

Por otro lado, se está investigando **nuevos métodos de obtención del ADN fetal**, como por ejemplo del frotis vaginal de gestantes. Este método detectaría células trofoblásticas presentes en el tracto genital femenino de las gestantes y, de esas células, se podría extraer el ADN fetal para su análisis. De esta manera se podría evitar las limitaciones actuales de la detección de *cff* ADN en plasma como la gran fragmentación del genoma fetal.^[87]

En el campo de la oncología ginecológica, se espera que en un futuro no muy lejano, los ensayos clínicos a gran escala respalden el uso de las biopsias líquidas en la práctica clínica habitual.

8. CONCLUSIONES

- 1) La indicación principal del test fetal no invasivo continúa siendo la detección de la trisomía 21 y, en menor medida las trisomías 13 y 18.
- 2) La utilización del test fetal no invasivo de las aneuploidías de los cromosomas sexuales no se recomienda para el cribado de la población general. Pero, en el caso de que se realizara, el asesoramiento antes de la realización de la prueba es indispensable.
- 3) No se recomienda el cribado de los síndromes de microdeleción en la población general por su baja prevalencia y su bajo valor predictivo positivo ya que revertiría el descenso del número de pruebas invasivas. En población de alto riesgo, el test fetal no invasivo no modificaría el manejo del embarazo.
- 4) Los continuos avances técnicos han permitido detectar cada vez más enfermedades monogénicas. Sin embargo, el cribado de estos trastornos se limita a los pacientes con historia familiar o embarazo previo afecto.
- 5) El síndrome de X frágil aún no se ha podido detectar mediante el test fetal no invasivo. Las guías clínicas recomiendan su diagnóstico mediante métodos invasivos para los pacientes con historia familiar de este trastorno.
- 6) El ADN libre fetal no se puede utilizar como marcador independiente de predicción en complicaciones obstétricas del embarazo como la preeclampsia, la restricción del crecimiento intrauterino o el parto pre-término.
- 7) El diagnóstico y monitorización de los cánceres ginecológicos mediante la detección del ADN tumoral circulante continúa siendo una técnica bajo investigación.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci.* 1948;142:241–243.
2. Hubel A. El ADN Circulante y sus aplicaciones clínicas. *Revista Genética Médica* [Internet].2018 [citado 17 Mar 2019]. Disponible en: <https://revistageneticamedica.com/blog/adn-circulante-aplicaciones-clinicas/>
3. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cellfree DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem.* 2010; 56: 1279-86.
4. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):139-42.
5. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cáncer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37: 646-50.
6. Lo YM, Corbetta N. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350(9076):485–487.
7. Carputo R. Diagnóstico prenatal no invasivo: ADN fetal libre en sangre materna. Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Universitario Virgen de la Nieves Granada. [monografía en Internet] 2014.
8. Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:1-7.
9. Ryan B, Corcoran MD. Application of cell DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med.* 2018;379:1754-65
10. Devaney S, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Non-invasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and metaanalysis. *JAMA.* 2011; 306:627-629
11. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998;339(24):1734-8.
12. Manzanares Galán S, Entrala Bernal C, Sánchez Gila M, Fernández-Rosado F, Cobo Aguilar D, Molina Molina L, *et al.* Diagnóstico no invasivo del Rh fetal en sangre materna en el primer trimestre de la gestación. *Gest y Eval Cost Sanit.* 2014;15(2):125-36.
13. Baños Álvarez E, Llanos Méndez A. Prenatal screening for aneuploidy using free fetal DNA in maternal blood. Systematic Review of the Literature. 2011.
14. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2001-11.
15. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017; 50: 302–314.
16. González de Agüero Laborda R, Lerma Puertas D, Corbacho Malo M, Revilla López. Nueva estrategia para la Detección de Aneuploidías fetales. Protocolo regional de Diagnóstico Prenatal de Defectos Congénitos 2016. Comunidad Autónoma de Aragón. SALUD.
17. Kagan KO, Hoopmann M, Hammer R, Stressig R, Kozlowski P. Screening for chromosomal abnormalities by first trimester combined screening and noninvasive prenatal testing. *Ultraschall Med.* 2015;36(1):40-6.
18. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, *et al.* Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun* 2016; 7: 11815.

19. Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy. *N Engl J Med.* 2018;379(5):464-473.
20. Martínez De LaPiscina I, Pérez de Nanclares Leal G. Nuevas tecnologías aplicadas en la detección de alteraciones genéticas. *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2018; 9(1):40-46.
21. Hardisty EE, Vora NL. Advances in genetic prenatal diagnosis and screening. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(6):635.
22. Husain H. Cancer DNA in the Circulation: the liquid biopsy. *JAMA.* 2017;318.
23. Mennuti MT, Chandrasekaran S. Cell-free DNA screening and sex chromosome aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2015 O;35(10):980-5.
24. Petersen AK, Cheung SW, Smith JL, *et al.* Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory. *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:691.e1-6.
25. Suo F, Wang C, Liu T, *et al.* Non-invasive prenatal testing in detecting sex chromosome aneuploidy: A large-scale study in Xuzhou area of China. *Clin Chim Acta.* 2018;481:139-141.
26. Zhang B, Lu BY, Yu B. Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood. *J Int Med Res.* 2017;45(2):621-630.
27. Wang Y, Chen Y, Tian F, *et al.* Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem.* 2014;60:251-9.
28. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, Woortmeijer H, Veldhuisen, *et al.* Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenatal Diagnosis.* 2015; 35(8): 754–760.
29. Advani HV, Barrett AN, Evans MI, Choolani M. Challenges in non-invasive prenatal screening for sub-chromosomal copy number variations using cell-free DNA. *Prenat Diagn.* 2017;37(11):1067-1075.
30. Shaffer BL, Norton ME. Cell-Free DNA screening for aneuploidy and microdeletion síndromes. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):13-26.
31. Liu H, Gao Y, Hu Z, Lin L, Yin X, Wang J, *et al.* Performance Evaluation of NIPT in Detection of Chromosomal Copy Number Variants Using Low-Coverage Whole-Genome Sequencing of Plasma DNA. *PLoS ONE.* 2016; 11(7): e0159233.
32. Helgeson J, Wardrop J, Boomer T, Almasri E, *et al.* Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):999-1004.
33. Martin K, Iyengar S, Kalyan A, Lan C, *et al.* Clinical experience with a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test for five clinically significant microdeletions. *Clin Genet.* 2018;93(2):293-300.
34. Sahoo T, Hovanes K, Strecker MN, Dzidic N, Commander S, Travis MK. Expanding noninvasive prenatal testing to include microdeletions and segmental aneuploidy: cause for concern? *Genet Med.* 2016;18:275-6.
35. Gross SJ, Stosic M, McDonald-McGinn DM, *et al.* Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:177-83.
36. Gerson KD, O'Brien BM. Cell-free DNA. Screening for single-gene disorders and determination of fetal rhesus D genotype. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2018; 45:27–39
37. Orphanet. Prevalencia de las enfermedades raras: Datos bibliográficos. *Orphanet.* 2019:1. Disponible en: www.orpha.net

38. Hayward J, Chitty LS. Beyond screening for chromosomal abnormalities: Advances in non-invasive diagnosis of single gene disorders and fetal exome sequencing. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018; 23(2):94-101.
39. Allen S, Young E, Bowns B. Noninvasive prenatal diagnosis for single gene disorders. *Curr Opin Obstetr Gynecol.* 2017;29(2):73–79.
40. Gutiérrez JF, Bajaj K, Klugman SD. Prenatal Screening for Fragile X: Carriers, Controversies, and Counseling. *Rev Obstet Gynecol.* 2013; 6(1): e1–e7.
41. Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet.* 2011; 80(3): 214–225
42. Milà M. El Síndrome X Frágil. *Ed Cont Lab Clin.* 2015; 20:32-40
43. Cronister A, Teicher J, Rohlfs EM, Donnenfeld A, Hallam S. Prevalence and instability of fragile X alleles: implications for offering fragile X prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2008;111:596–601
44. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics, authors. ACOG Committee Opinion No. 691: Carrier screening for genetic conditions. *Obstet Gynecol* 2017;129:e41–55.
45. Mak AS, Leung KY. Challenges in prenatal screening and counselling for fragile X syndrome. *Hong Kong Med J.* 2017; 23(2):108-9.
46. Jelin AC, Vora N. Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):69-81.
47. Westgren M, Götherström C. Stem cell transplantation before birth - a realistic option for treatment of osteogenesis imperfecta? *Prenat Diagn* 2015;35: 827e32.
48. ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* 2012;14(8):759–61.
49. Illanes S, Parra M, Serra R, Pino K, Figueroa-Diesel H, Romero C, *et al.* Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2009;29(12):1118–22.
50. Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, Tirosh D *et al.* Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200360.
51. Muñoz-Hernández R, Medrano-Campillo P, Miranda ML, *et al.* Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Am J Hypertens.* 2017;30(7):673-682.
52. Rolnik DL, O’Gorman N, Fiolna M, *et al.* Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015; 45(1): 106–111.
53. Rolnik DL, da Silva Costa F, Lee TJ, *et al.* Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018; 52(6): 722–727. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(6):722-727.
54. Contro E, Bernabini D, Farina A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther.* 2017; 21(2): 125–135.
55. Al Nakib M, Desbrière R, Bonello N, Bretelle F, Boubli L, Gabert J and Levi-Mozziconacci A. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther* 26: 24-28, 2009
56. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904–1905.

57. Quezada MS, Francisco C, Dumitrescu-Biris K, Nicolaides KH and Poon LC. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;45:101-105.
58. Dugoff L, Barberio A, Whittaker PG, Schwartz N, Sehdev H, Bastek JA. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215(2):231.e1-7.
59. Beaver JA, Jelovac D, BaluKrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky DJ, *et al.* Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 May; 20(10): 2643–50
60. Bidard FC, Pierga JY. Clinical utility of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015 May; 33(14): 1622.
61. Kammesheidt A, Tonozzi TR, Lim SW, Braunstein GD. Mutation detection using plasma circulating tumor DNA (ctDNA) in a cohort of asymptomatic adults at increased risk for cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2018;91:1–12.
62. Buono G, Gerratana L, Bulfoni M, Provinciali N, Basile D, Giuliano M, Corvaja C, Arpino G, Del Mastro L, De Placido S, De Laurentiis M, Cristofanilli M, Puglisi F. Circulating tumor DNA analysis in breast cancer: is it ready for prime-time?. *Cancer Treatment Reviews.* 2019.
63. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016;10:464–474.
64. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, *et al.* Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015 Aug; 7(302): 302ra133.
65. Eigeliene N, Saarenheimo J, Jekunen A. Potential of Liquid Biopsies for Breast Cancer Screening, Diagnosis, and Response to Treatment. *Oncology* 2019;96:115-124.
66. Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M, *et al.* Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for ovarian Cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(6):e0155495.
67. Vanderstichele A, Busschaert P, Smeets D, Landolfo C, Van Niswenhuyzen E, Leunen K, Neven P, Amant F, Mahner S, Braica EI, *et al.* Chromosomal instability in cell-free DNA, a highly specific biomarker for detection of ovarian cancer in women with adnexal mass. *Clin. Cancer Res.* 2017;23:2223–2231.
68. Weigelt B, Comino-Méndez I, de Bruijn I, *et al.* Diverse BRCA1 and BRCA2 Reversion Mutations in Circulating Cell-Free DNA of Therapy-Resistant Breast or Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2017;23:6708–6720.
69. Barbosa A, Peixoto A, Pinto P, Pinheiro M, Teixeira MR. Potential clinical applications of circulating cell-free DNA in ovarian cancer patients. *Expert Rev Mol Med.* 2018 Dec 18;20:e6.
70. Muinelo-Romay L, Casas-Arozamena C, Abal M. Liquid Biopsy in Endometrial Cancer: New Opportunities for Personalized Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:2311
71. Cicchillitti L, Corrado G, De Angeli M, *et al.* Circulating cell-free DNA content as blood based biomarker in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2017;8:115230–43
72. Bolivar AM, Luthra R, Mehrotra M, Chen W. Targeted next-generation sequencing of endometrial cancer and matched circulating tumor DNA: identification of plasma-based, tumor-associated mutations in early stage patients. *Mod Pathol.* 2019;32(3):405–414.
73. Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, Sebra R, *et al.* Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145754.

