

Trabajo Fin de Grado

Estudio Comparativo de las técnicas de NGS frente a
las convencionales en el diagnóstico genético
prenatal

Comparative study of NGS techniques versus
traditional techniques in prenatal genetic diagnosis

Autor/es

Nuria Gracia Ruiz

Director/es

Eva Barrio Ollero
Silvia Izquierdo Álvarez

Grado en Medicina

FACULTAD DE MEDICINA
2025

ÍNDICE

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	5
GLOSARIO	5
INTRODUCCIÓN	7
- Técnicas de diagnóstico genético	7
Análisis indirecto	7
1. Array-CGH	7
2. Cariotipo	7
3. FISH	7
Análisis de una mutación de forma directa	8
1. Microarrays	8
2. QF-PCR	9
3. Secuenciación de ADN de alto rendimiento	9
- Fases de Next Generation Sequencing	10
MATERIAL Y MÉTODOS	13
MARCO TEÓRICO	15
- Aneuploidías	15
1. Aneuploidías más frecuentes	15
2. Hallazgos ecográficos	16
- Pruebas de cribado genético	16
- Técnicas de diagnóstico prenatal invasivas	17
1. Amniocentesis	17
2. Biopsia Corial	17
3. Cordocentesis	18
- Técnicas de diagnóstico prenatal no invasivo	18
- Estudios genéticos en muestras fetales y asesoramiento	19
- Indicaciones para el uso de NGS en el diagnóstico genético prenatal	22
- Recientes investigaciones	24
- Tecnologías Complementarias	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

En el diagnóstico prenatal, la técnica de TPNI (a través del ADN fetal en sangre materna) es fundamental ante un riesgo intermedio en el cribado combinado del primer trimestre y de cuyo resultado dependerá la necesidad de realización de una técnica invasiva posterior, como la amniocentesis o la coriocentesis. Ambas presentan una tasa de pérdida fetal reducida, pero que no hay que infravalorar.

A través de datos pseudonimizados de 354 gestantes se realizó una tabla de validez diagnóstica para valorar la utilidad de esta técnica en la detección de anomalías ecográficas, muchas de las cuales correspondían a marcadores de aneuploidías fetales: síndrome de Down, Edwards y Patau. Sin embargo, obtuvimos bajos valores de sensibilidad, especificidad y VPP de la prueba, lo que no era de extrañar por tratarse esta de una técnica de cribado y de intentar valorar la detección de anomalías ecográficas, muchas de las cuales podrían presentarse de manera aislada sin corresponder a ninguna aneuploidía fetal. Pero, lo que verdaderamente fue satisfactorio consistió en el resultado del VPN (92%) que corroboró la utilidad de esta técnica para descartar resultados de normalidad fetal y evitar una técnica invasiva posterior innecesaria.

A su vez, este trabajo pretende exponer la utilidad de las diferentes técnicas de diagnóstico genético y realizar una comparación de las mismas en la detección de aneuploidías u otras alteraciones genéticas fetales que la ecografía por sí sola no es capaz de detectar. De esta manera, también se realiza un análisis mediante Chi-cuadrado que permite una comparación entre los resultados del riesgo del cribado combinado del primer trimestre y los del riesgo del TPNI que se había realizado posteriormente (en los casos de riesgo intermedio) y se valora si existe correlación entre los resultados del cribado y los resultados del TPNI, hallándose resultados estadísticamente significativos que corroboran la utilidad de esta técnica de cribado.

ABSTRACT

In prenatal diagnosis, the NIPT technique (using fetal DNA in maternal blood) is essential for patients with intermediate risk in combined screening in the first trimester. The result of this technique will determine the need for a subsequent invasive technique such as amniocentesis or choriocentesis. Both have a low rate of fetal loss, but should not be underestimated.

Using pseudonymized data from 354 pregnant women, a diagnostic validity table was developed to assess the usefulness of this technique in detecting ultrasound abnormalities, many of which corresponded to markers of fetal aneuploidies: Down syndrome, Edwards syndrome, and Patau syndrome. However, we obtained low sensitivity, specificity, and PPV values for the test, which was not surprising for the fact that this is a screening technique and its objective is to assess the detection of ultrasound abnormalities, many of which could occur in isolation without corresponding to any fetal aneuploidy. However, that was truly satisfactory was the NPV result (92%), which corroborated the usefulness of this technique

in ruling out normal fetal outcomes and avoiding unnecessary subsequent invasive procedures.

This study also aims to demonstrate the usefulness of different genetic diagnostic techniques and compare them in the detection of aneuploidies or other fetal genetic abnormalities that ultrasound alone cannot detect. A chi-square analysis is performed to allow a comparison between the results of the combined first-trimester screening risk and those of the NIPT risk, which was subsequently carried out later (in cases of intermediate risk). The analysis evaluates whether there is a correlation between the screening results and the NIPT results, revealing statistically findings that support the usefulness of this screening technique.

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico prenatal. Secuenciación de Nueva Generación. Test Prenatal No Invasivo (TPNI). Aneuploidía. Cribado Combinado. ADN fetal. Pruebas Genéticas.

GLOSARIO

Array-CGH: array de hibridación genómica comparativa

FISH: hibridación in situ de fluorescencia

PAPP-A: proteína A asociada al embarazo

β -hCG: Gonadotropina coriónica humana beta

NGS: Next Generation Sequencing – Secuenciación de Nueva Generación

PCR: Reacción de cadena polimerasa

FISH: Hibridación in situ de fluorescencia

SNPs: Single Nucleotide Polymorphism– Polimorfismos de Nucleótido Único

STR: Short Tandem Repeats – Repeticiones Cortas en Tándem

T21: trisomía del cromosoma 21

T18: trisomía del cromosoma 18

T13: trisomía del cromosoma 13

QF-PCR: reacción de cadena polimerasa cuantitativa fluorescente

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

CNVs: variantes del número de copias (referido al ADN)

SNVs: variantes de un solo nucleótido

array-CGH: Hibridación Genómica Comparativa de array

TN: translucencia nuchal

IR: índice de riesgo

CIR: crecimiento intrauterino restringido

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

TPNI: Test Prenatal no Invasivo

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

ARSA: arteria subclavia derecha aberrante aislada

PVUD: persistencia de la vena umbilical derecha

QPC: quiste del plexo coroideo)

FOCI: foco hiperecogénico intracardíaco

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal es una herramienta fundamental que permite la detección de patología genética fetal previa al nacimiento. Tradicionalmente, se ha requerido la realización de procedimientos invasivos tales como la amniocentesis, la biopsia corial o la cordocentesis para la detección de aneuploidías, patologías monogénicas y anomalías estructurales de origen cromosómico. Sin embargo, el hecho de que estas técnicas puedan resultar lesivas, tanto para la madre como para el feto, ha conllevado el desarrollo de técnicas no invasivas para la detección de trastornos genéticos (1,2).

Debido al elevado coste ético y económico, no se recomienda realizar estas técnicas de forma indiscriminada en la población. De este modo, nuestro Sistema Nacional de Salud incluye una serie de pruebas de cribado para la detección de anomalías cromosómicas que pueden ser realizadas durante la gestación. Estas técnicas incluyen: el test combinado del primer trimestre (a través de PAPP-A, β hCG y medición de translucencia nuchal a través de ecografía junto a la edad materna). Además, en caso de que el anterior saliera alterado, tradicionalmente se habían incluido pruebas de diagnóstico genético prenatal invasivas (amniocentesis y biopsia corial), sin embargo, recientemente se incluye un test de ADN fetal libre circulante en sangre materna en caso de riesgo de trisomía fetal limitado a los cromosomas 21, 18 o 13 (Ministerio de Sanidad, Orden SND/606/2024, de 13 de junio). A su vez, el Ministerio de Sanidad expone que serán las comunidades autónomas, el Instituto Nacional de Gestión Sanitaria (INGESA) y las mutualidades de funcionarios los encargados de valorar el riesgo individual de las mujeres gestantes con criterios de alto riesgo para las que se seguirán procedimientos más específicos de actuación (3).

- Técnicas de diagnóstico genético (1)

Análisis indirecto: detectan alteraciones estructurales o cromosómicas en el ADN, pero no analizan la secuencia específica de este. Se distinguen los siguientes tipos:

1. Array-CGH (array-hibridación genómica comparativa)

Puede ser utilizada para detectar CNVs (variantes en el número de copias de ADN) tales como deleciones o duplicaciones de regiones cromosómicas. No detecta translocaciones o inversiones.

En el caso del array-CGH, el control es hibridado con un microarray que contiene de cientos a miles de oligonucleótidos cuyas secuencias corresponden a regiones específicas del genoma.

2. Cariotipo

Estudio del número y tipo de cromosomas presentes en un individuo. Los cromosomas se clasifican según su talla y colocación del centrómero. Un cariotipo normal femenino se denomina como 46 XX y un cariotipo masculino se designa como 46 XY.

3. FISH (Hibridación in situ de fluorescencia)

Requiere el diseño de una sonda de ADN monocatenaria complementaria con una región específica de un cromosoma y es preparada y marcada con un tinte fluorescente. El ADN del paciente obtenido de cromosomas en fases de metafase, profase o interfase, se desnaturaliza y posteriormente, la sonda produce el emparejamiento de bases complementarias (hibridación) con la secuencia del ADN del paciente coincidente. Tras la hibridación, la fluorescencia de la sonda puede observarse bajo el microscopio identificando de forma exacta la ubicación del segmento del ADN.

A pesar de lo que pudiera parecer esta técnica se considera indirecta porque no analiza directamente la secuencia del ADN de genes implicados.

Análisis de una mutación de forma directa

Se trata de una técnica de diagnóstico más utilizada que la de análisis indirecto que conlleva un diagnóstico directo mediante la detección de una mutación.

Al detectarse una mutación en la secuencia de ADN, se puede realizar una amplificación de la secuencia mediante PCR (reacción de cadena polimerasa) y con posterioridad se sintetiza un oligonucleótido alelo-específico que se encarga de la hibridación (combinación con base complementaria) con la secuencia mutada dando lugar a que, en caso de homocigotos con la mutación, la hibridación se producirá con el oligonucleótido alelo-específico que presente la secuencia mutada (ya que la persona presentará los dos alelos mutados), y en el caso de ser heterocigota, la sonda sólo se unirá a la copia que esté mutada. Por otro lado, en caso de que el paciente no presente la mutación, la sonda no se unirá.

Esto da lugar a que cada enfermedad diferente con sus distintas mutaciones requiera su propia sonda de oligonucleótido.

Este procedimiento tiene como ventajas su mayor precisión con respecto al análisis indirecto y no requiere la información de la presencia de enfermedad genética en la familia para su identificación. Su principal desventaja reside en la circunstancia de que existan diferentes mutaciones causantes de una misma enfermedad porque requiere el conocimiento de la mutación causante de la misma.

Tipos:

1. Microarrays

Permite realizar un análisis de múltiples variantes en la secuencia de ADN en un único tiempo mediante el empleo de gran cantidad de sondas de oligonucleótidos de hibridación frente al ADN en un chip de silicona. Se trata de una técnica de bajo coste y eficiente para la detección de las mutaciones de la secuencia de ADN presente en la plataforma de microarrays. Además, puede ser utilizada para la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), variaciones en el número de copias (CNVs) o diferencias en la expresión de genes. Esta técnica puede utilizar la hibridación genómica comparativa de matriz (array CGH), más convencional, una matriz basada en SNP (chip SNP) o, de forma más reciente, una plataforma que combina ambas.

Sin embargo, este método resulta ineficaz para detectar translocaciones balanceadas y triploidías.

2. QF-PCR

Es una técnica que se realiza a través de la reacción de cadena de polimerasa y que se emplea para analizar marcadores de repeticiones cortas específicas en tándem (STR) de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. Es una técnica costo-efectiva y rápida que ha evolucionado mediante la adición de nuevos marcadores microsatélites para la detección de regiones cromosómicas específicas (4).

3. Secuenciación de ADN de alto rendimiento ("Next Generation Sequencing")

Esta técnica tiene la capacidad de detectar todas las variantes patogénicas de una enfermedad, incluidas aquellas todavía no descubiertas y de las cuales todavía no hay conocimiento de su influencia a nivel fenotípico. Puede ser una secuencia dirigida a un número de enfermedades hereditarias (limitada a los genes en el panel de genes a estudiar), o bien, puede estar realizada mediante la secuenciación del exoma o del genoma completo que pueden detectar todas las variantes patogénicas de la enfermedad.

Se considera que es la mejor técnica para la secuenciación de ADN repetitivo (por ejemplo secuencias de repetición CTG en la enfermedad de Huntington) (5).

Para el análisis de los datos que se generan a través de NGS, se requiere la utilización de herramientas bioinformáticas, comenzando con el preprocesamiento de datos que incluye: la eliminación de secuencias de adaptadores y lecturas de baja calidad, la realización de un mapeo del genoma de referencia, así como la recopilación de secuencias de ADN. Este proceso genera grandes cantidades de datos y se manejan múltiples muestras simultáneamente, lo que supone un importante desafío en la gestión de tales cantidades de volúmenes de datos y las investigaciones continúan avanzando para mejorar la tecnología y los métodos de análisis de datos que se presentará como un hecho importante en los próximos años en el análisis de muestras biológicas (6, 7).

Además de su utilidad en genómica, se considera una técnica prometedora en transcriptómica y epigenética por su potencial lectura de ARNs completos y detección de metilación (5).

También, la secuenciación a través de NGS sigue en continuo desarrollo gracias al constante progreso en bioinformática, robótica, sistemas para la automatización de manipulación de líquidos y preparación de ácidos nucleicos, que se prevé que conlleve una mayor precisión y rapidez de estos métodos de secuenciación haciendo que necesiten cantidades menores de ADN. A su vez, se presentan las siguientes perspectivas futuras en el diagnóstico clínico: en la identificación de predisposiciones genéticas para implementar estrategias de prevención personalizadas, en la secuenciación rápida de genomas de patógenos para manejar posibles pandemias y resistencia a antibióticos, así como la monitorización de terapias génicas y edición genéticas para asegurar eficacia y seguridad (6).

- Fases de Next Generation Sequencing

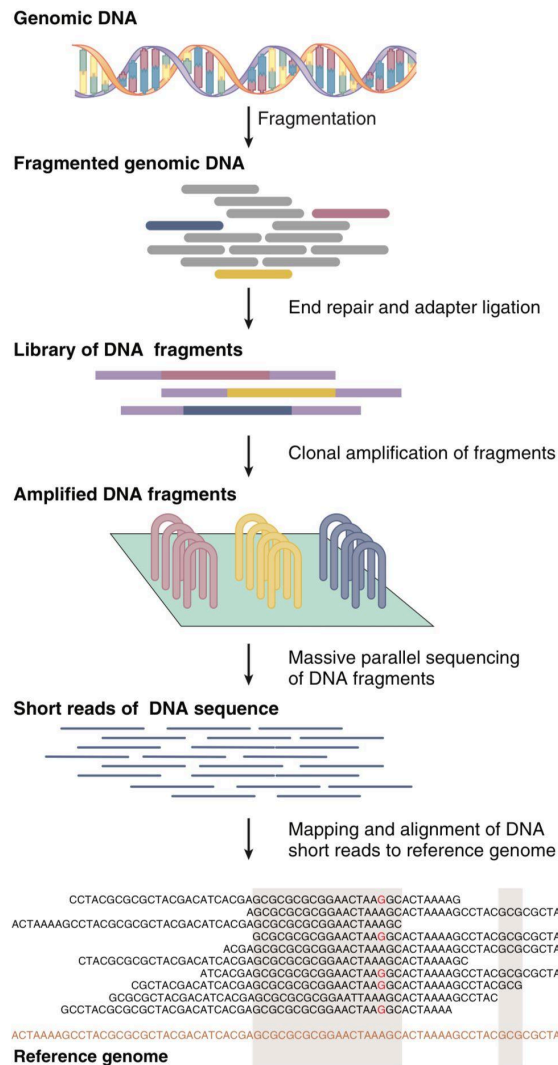


Imagen 1: Fases de Next Generation Sequencing (1)

Para comprender mejor el funcionamiento de esta técnica se expone la siguiente imagen. Esta, muestra el proceso de acción de la secuenciación de ADN de alta resolución mediante Illumina:

1. Para comenzar, se realiza la sección del ADN en pequeños fragmentos en cuyos extremos se añaden adaptadores que se tratan de secuencias de ADN ya conocidas que permiten que se identifiquen estos fragmentos de forma adecuada.
2. Posteriormente, se separa la doble hélice de ADN y se posicionan los fragmentos de ADN monocatenario en una superficie de cristal.
3. Luego, los fragmentos de ADN se amplifican en múltiples copias mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) para garantizar suficiente ADN para la secuenciación.
4. La secuenciación se basa en la adhesión de los fragmentos de ADN con sus adaptadores a una superficie de cristal y la posterior adición de bases

complementarias nuevas con una etiqueta de fluorescencia incorporada. La señal de fluorescencia es grabada mediante una cámara que revela la secuencia de pares de bases de cada fragmento permitiendo la secuenciación de millones de fragmentos de manera simultánea y se producen reacciones en paralelo.

5. Las lecturas cortas del ADN se alinean para referenciar el genoma y se ensamblan *de novo* (en caso de no tener una secuencia de referencia conocida), o bien, se produce un alineamiento de las lecturas a través de secuencias de referencia conocidas. Esto se realiza gracias a un software.
6. Para finalizar, se realiza un análisis bioinformático con identificación de variantes y posterior análisis funcional donde las variantes identificadas se correlacionan con enfermedades o rasgos fenotípicos.

Tabla 1: Diferencias entre los tipos de diagnóstico genético mediante NGS.

Tipos de estudios de genes	Secuencia de genoma completo	Secuencia de exoma completo	Panel genético dirigido
Número de genes	Todos los genes y ADN no codificado (secuencias de 10.000-100.000 pares de bases)	Exoma completo (20-25.000 genes)	10-500 genes
Precisión	Baja	Buena	Alta
Coste	Muy elevado	Bajo	Mayor costo-efectividad
Ventajas	Sin sesgos en secuenciación La mejor para la detección de variantes estructurales	Mismo experimento para cualquier enfermedad Puede ser reinterpretado	Se puede optimizar Riesgo bajo de hallazgos de significado incierto Facilidad de manejo de datos e interpretación
Desventajas	Manipulación e interpretación compleja de datos, Posibles hallazgos con significado incierto	Sesgos en la secuenciación, No da información de regiones no codificantes, posibilidad de hallazgos con significado incierto	Diseño y rediseño necesarios para nuevos loci
Resolución	>30X	>50-100X	>500X

Tabla 1: Diferencias entre tipos de diagnóstico genético a través de NGS: secuencia de genoma completo, secuencia de exoma completo (secuencia de las regiones codificantes del genoma) y panel genético dirigido (paneles específicos dirigidos al estudio de enfermedades concretas) que la relaciona en función del número de genes, su precisión, coste, desventajas y resolución (1,9).

De esta forma, debemos tener en cuenta que existen diversos tipos de técnicas de diagnóstico genético, aquellas que emplean un análisis indirecto y aquellas que analizan una mutación de forma directa, siendo esta última, más utilizada. Dentro de los tipos de pruebas genéticas que emplean el análisis de mutación de manera indirecta se encuentran el cariotipo, técnica de FISH (Hibridación in situ de fluorescencia) y técnica de array-CGH (array-hibridación genómica comparativa). Por otro lado, las técnicas genéticas que localizan una mutación directa incluyen QF-PCR, microarrays y NGS o secuenciación de ADN de alto rendimiento ("Next Generation Sequencing") (1).

En este contexto, las técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing- NGS) han permitido revolucionar el campo de la genética a través del análisis de fragmentos de ADN con gran precisión y rapidez permitiendo el diagnóstico prenatal no invasivo. Estas técnicas se realizan mediante la extracción del ADN fetal en sangre materna que consiste en la fracción de ADN fetal extracelular que puede ser detectada en la sangre de las mujeres embarazadas y permite poder hallar de forma fiable la existencia de una alteración genética en el feto a través de la reacción de cadena polimerasa (PCR) (1, 8).

Cabe destacar que las técnicas de diagnóstico genético prenatal no invasivas no pueden ser ofertadas en la práctica médica habitual para el diagnóstico de aneuploidía fetal en ausencia de una técnica invasiva posterior confirmatoria, ya que el estudio del ADN fetal en sangre materna es una técnica de cribado y aporta una probabilidad de riesgo, pero no aporta un diagnóstico definitivo (9).

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Valorar la utilidad de las técnicas de diagnóstico genético prenatal no invasivo (TPNI) mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) a través de la obtención de ADN fetal en sangre materna.
2. Realizar una revisión bibliográfica de la utilidad de las técnicas genéticas para el diagnóstico prenatal.
3. Estudiar la validez de las técnicas de NGS para el diagnóstico de aneuploidías fetales y para la detección de malformaciones.
3. Analizar la detección de riesgo de anomalías genéticas en la prueba de Cribado Combinado del primer trimestre de gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica sobre las diferentes técnicas de diagnóstico genético y su correlación con el diagnóstico prenatal, incluyendo los protocolos actualizados de la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia), así como las últimas investigaciones sobre NGS. Se realizó la búsqueda en diferentes bases de datos incluyendo Pubmed, Scopus y Google académico. Además, se hizo la siguiente búsqueda en Pubmed restringida a los últimos 10 años:

((("Prenatal Diagnosis"[Mesh]) OR "Noninvasive Prenatal Testing"[Mesh]) AND ("High-Throughput Nucleotide Sequencing"[Mesh])) OR (("Amniocentesis"[Mesh]) OR "Chorionic Villi Sampling"[Mesh])

Y, a su vez, se incluyeron otras obras de años previos localizadas en bases de datos incluídas previamente.

Se realizó la petición de datos a través de la plataforma BIGAN (Big Data del Departamento de Sanidad del Gobierno de Aragón) del Hospital Universitario Miguel Servet en los años 2023 y 2024 de los resultados del Cribado Combinado del primer trimestre de embarazo realizados y que presentan resultado de intermedio y alto riesgo y con realización de una prueba invasiva genética (ADN fetal en sangre materna) o invasiva (amniocentesis o biopsia corial) posterior, además se piden los datos ecográficos que resulten patológicos (Anexo I).

Al comienzo del proceso se realizó la petición de los siguientes datos:

Un primer conjunto de datos de mujeres embarazadas con realización de pruebas invasivas (amniocentesis, biopsia corial, cordocentesis) durante periodo de observación de dos años, 2023 y 2024, con las siguientes variables solicitadas:

- Mujeres embarazadas con seguimiento en Hospital Miguel Servet a las que se les hubiese realizado cribado combinado del primer trimestre con resultado alterado y requerimiento de técnica diagnóstica invasiva posterior confirmatoria o bien mujeres a las que se les hubiese realizado una técnica diagnóstica prenatal invasiva por otro motivo.
- Resultados del cribado combinado del primer trimestre.
- Resultado de la prueba invasiva (mujeres con complicaciones si es que existen: pérdida fetal...).
- Informes de ecografías realizadas a dichas pacientes con resultado ecográfico patológico.
- Edad materna.
- Semanas de embarazo a las que se realizó la prueba.
- Tiempo desde la realización de la prueba hasta la entrega del resultado a la paciente.
- Añadir en caso de que lo sea, si se trata de embarazo múltiple.
- Coste de la prueba (si es posible conocerlo).

Además, se solicitó un segundo conjunto de datos de mujeres embarazadas a las que se les realizaron pruebas no invasivas (ADN fetal en sangre materna) durante el año 2024 con las siguientes variables solicitadas:

- Mujeres embarazadas con seguimiento en Hospital Miguel Servet a las que se les hubiese realizado cribado combinado del 1er trimestre con resultado alterado y requerimiento de técnica diagnóstica invasiva posterior confirmatoria o bien mujeres

a las que se les hubiese realizado una técnica diagnóstica prenatal invasiva por otro motivo.

- Resultados del cribado combinado del 1er trimestre.
- Resultado de la prueba invasiva (mujeres con complicaciones si es que existen: pérdida fetal, entre otras).
- Informes de ecografías realizadas a dichas pacientes con resultado ecográfico patológico.
- Edad materna.
- Semanas de embarazo a las que se realizó la prueba.
- Tiempo desde la realización de la prueba hasta la entrega del resultado a la paciente.
- Añadir en caso de que lo sea, si se trata de embarazo múltiple.
- Coste de la prueba (si es posible conocerlo).

Sin embargo, debido a que la plataforma BIGAN no pudo ofrecer todos los datos que se solicitaron, se modificó el planteamiento del trabajo y realizar un análisis descriptivo de los datos en los que se pretendía cuantificar la sensibilidad y especificidad de los TPNI (mediante NGS) para la detección de aneuploidías. Los datos aportados consistían en: el riesgo de la prueba de cribado del primer y/o segundo trimestre y los resultados posteriores de las técnicas no invasivas (si habían obtenido alto o bajo riesgo de aneuploidías) o técnicas invasivas (tan solo el resultado de no haber detectado aneuploidías) y, en caso de que los hubiera, los resultados patológicos ecográficos. La muestra tenía una n de 354 gestantes.

Test estadísticos

De esta manera, se realizó el análisis estadístico de los datos a través de la síntesis de tablas de contingencia mediante la plataforma SPSS. Por una parte, se creó una primera tabla que pretendía correlacionar los hallazgos ecográficos con la detección de aneuploidías mediante el TPNI y se realizó el estudio de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, para detectar malformaciones ecográficas o no detectar hallazgos, en caso de que hubiera normalidad ecográfica.

Por otro lado, se realizaron una serie de tablas para valorar la utilidad de la prueba de cribado del primer trimestre y su correlación con el resultado del TPNI, a través del índice de Chi-cuadrado de Pearson.

El presente estudio contó con la aprobación por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad Autónoma de Aragón (CEICA) que emitió dictamen favorable para su realización el día 14/03/2025 y con validez hasta diciembre de 2025 (Anexo II).

MARCO TEÓRICO

- Aneuploidías (10)

Una aneuploidía o anomalía cromosómica numérica hace referencia a una modificación en la dotación cromosómica (número de cromosomas de un individuo) que son debidas a errores en la gametogénesis o en las primeras divisiones del cigoto.

Las aneuploidías pueden deberse a la pérdida de un cromosoma (monosomía), ganancia de un cromosoma (trisomía) o de varios cromosomas, o de una dotación haploide completa (6).

1. Aneuploidías más frecuentes

Dentro de las aneuploidías más frecuentes podemos destacar: el Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), el síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13) y el Síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18) cuyas principales características se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 2: Características de las principales aneuploidías

	T21	T13	T18
Síndrome	Síndrome de Down	Síndrome de Patau	Síndrome de Edwards
Cariotipo	47 XX +21, o 47 XY +21	47 XX +13, o 47 XY +13	47 XX + 18, o 47 XY +18
Características fenotípicas	Epicanto Perfil facial plano Manchas de Brushfield Clinodactilia en el 5º dedo Surco transversal único en mano Braquidactilia (dedos cortos) Hipotonía general Posible cardiopatía congénita (comunicación AV-40%) Mayor riesgo de leucemia Enfermedad de Hirschsprung Hipotiroidismo	Holoprosencefalia Hipotelorismo Defectos cutáneos del cuero cabelludo Retraso mental grave Displasia renal Polidactilia postaxial Pies en mecedora Posibles defectos cardíacos Posible labio leporino	Defectos cardíacos Bajo peso al nacer Deformidad en la flexión de los dedos Retraso mental grave Occipucio prominente
Esperanza de vida	50-60 años (cardiopatía congénita causa más frecuente)	95% fallece el primer año de vida	95% fallece el primer año de vida

Características principales de aneuploidías: trisomía del cromosoma 21, trisomía del cromosoma 13, trisomía del cromosoma 18 (10).

2. Hallazgos ecográficos

En los casos de gestación de bajo riesgo se realizan tres ecografías en el primer, segundo y tercer trimestre y presentan las siguientes tasas de detección prenatal (11):

- Ecografía del primer trimestre (11-13.6 semanas de gestación): presenta una tasa de detección del 20-45%.
- Ecografía del segundo trimestre (18-22 semanas de gestación): su tasa de detección es del 30-50%.
- Ecografía del tercer trimestre (35-36 semanas de gestación): incrementa la tasa de detección un 5-15%. A su vez, en un 5-10% de los casos el diagnóstico se realiza en el período postnatal.

En cuanto a los marcadores ecográficos más sensibles para la trisomía del cromosoma 21 se encuentran: ARSA (arteria subclavia derecha aberrante), ausencia o hipoplasia de hueso nasal, ventriculomegalia y pliegue nuchal. Además, aunque los quistes de plexos coroideos (QPC) no forman parte de los marcadores utilizados para reajustar el riesgo para el síndrome de Down, su presencia supone un riesgo incrementado para el síndrome de Edwards. Sin embargo, en ausencia de otras anomalías, el QPC aislado no modifica el riesgo y debe ser considerado como una variante de la normalidad y no precisa seguimiento (12).

Es importante resaltar que, hoy en día, existe cierta controversia a la hora de recomendar la realización de una prueba invasiva tras la obtención de una anomalía ecográfica, que se recomienda en unos grupos de forma sistemática, mientras que en otros, se aboga porque esta se base en el riesgo establecido de asociación con anomalías cromosómicas para una determinada anomalía ecográfica (12). Algunos estudios concluyen que la selección cuidadosa de fenotipos fetales específicos y la utilización de un equipo multidisciplinar previo a la prueba puede incrementar el diagnóstico a más del 30% (13).

- **Pruebas de cribado genético** (Ministerio de Sanidad, Orden SND/606/2024) (3)

En España, se realiza un cribado a través de un test combinado en el primer trimestre de gestación que se compone de una prueba bioquímica a través de la detección de una glicoproteína producida por el trofoblasto (PAPP-A) y de la β hCG (porción beta libre de la gonadotropina coriónica humana), asociada a esta se realiza una prueba ecográfica de medición de la translucencia nuchal (TN).

Hoy en día, estas pruebas deben ser ofrecidas a todas las mujeres embarazadas independientemente de su edad y se encargan de identificar fetos con riesgo alto de desarrollar anomalías genéticas (riesgo $>1/250$). En aquellos casos en los que se confirme la situación de alto riesgo, posteriormente deberá realizarse una prueba posterior confirmatoria. Tradicionalmente, se habían incluido pruebas de diagnóstico genético prenatal invasivas (amniocentesis y biopsia corial), sin embargo, recientemente se incluye un test de ADN fetal libre circulante en sangre materna en caso de riesgo de trisomía fetal limitado a los cromosomas 21, 18 o 13 (Ministerio de Sanidad, Orden SND/606/2024, de 13 de junio).

Según establece la SEGO: Ante un índice de riesgo (IR) ≥ 1 en 50, malformación ecográfica o translucencia nuchal (TN) ≥ 3.5 se debe realizar una prueba invasiva posterior QF-PCR para trisomías (T21, 18 y 13) y, en caso de T21 o 13, se realizará un cariotipo. En caso de QF-PCR normal y malformación ecográfica o TN ≥ 3.5 mm se realizará un estudio genético mediante técnica de array. Por otro lado, ante un IR de 1 en 50- 1 en 250 sin anomalía ecográfica asociada, se realizará un test de cribado mediante ADN fetal en sangre materna, que en caso de que resultase positivo, se realizaría una técnica invasiva posterior con las mismas recomendaciones establecidas para el grupo anterior. Por último, en caso de IR $< 1/250$, se informará del resultado y finalizará la estrategia de cribado (14-15).

En Aragón, el protocolo que existe incluye en riesgo intermedio a aquellos casos con IR comprendido entre 1/10 y 1/1000, riesgo alto con IR $< 1/10$ y riesgo bajo a IR $> 1/1000$.

- Técnicas de diagnóstico prenatal invasivas

1. Amniocentesis

La amniocentesis consiste en un procedimiento invasivo de diagnóstico prenatal que comenzó a ser utilizado a partir de 1970. Esta técnica consiste en la obtención de células del líquido amniótico (amniocitos) mediante una punción ecoguiada que puede realizarse después de las 16 semanas de gestación con fines diagnósticos mediante evaluaciones cromosómicas, bioquímicas, histopatológicas y microbianas, o bien, con finalidad terapéutica para reducir el volumen de líquido amniótico en pacientes con presencia de polihidramnios (16).

En el análisis genético de los amniocitos puede emplearse hibridación in situ mediante fluorescencia (FISH) que permite diagnosticar aneuploidías requiriendo posteriormente una confirmación mediante técnicas citogenéticas (1).

Sus indicaciones principales son: edad materna > 35 años, hijo previo con alteración cromosómica, historia de alteración estructural cromosómica en un familiar, historia familiar de defecto genético diagnosticable mediante análisis bioquímico de DNA, aumento de riesgo de defectos del tubo neural debido a historia familiar o cuádruple screening anormal. Algunas de sus principales desventajas son: diagnóstico genético tardío, riesgo de pérdida fetal, fuga de líquido amniótico, entre otros. Además algunos mosaicismos cromosómicos pueden conllevar diagnósticos erróneos (1).

2. Biopsia Corial

La biopsia corial o coriocentesis es una técnica invasiva que consiste en la obtención de vellosidades coriales (tejido trofoblástico fetal) vía transcervical o transabdominal con el objetivo de realizar un análisis posterior molecular, bioquímico o citogenético. Este procedimiento requiere un importante conocimiento técnico y experiencia del operador debido a la complejidad de su realización y que se ha relacionado directamente con el riesgo aumentado de pérdida fetal.

Sin embargo, condiciona posibles problemas o complicaciones secundarias: posibilidad de muestra insuficiente o inadecuada, riesgo de pérdida fetal, corioamnionitis, aparición de hematomas placentarios, despegamiento corial, ruptura prematura de membranas o reducción de extremidades. Cuando es realizada por vía transcervical por un operador

experimentado el riesgo de pérdida fetal es similar al de la amniocentesis, correspondiendo a un 0,5% (2).

3. Cordocentesis

Se realiza después de las 16 semanas de gestación mediante la obtención de sangre de cordón umbilical. Este procedimiento se emplea para la realización de análisis citogenético, hematológico o bien para confirmar un mosaicismo.

El riesgo de pérdida de bienestar fetal mediante este procedimiento es ligeramente superior frente al de la amniocentesis o al de la biopsia corial (1). Algunos estudios lo estiman entre 3-5% (17).

- **Técnicas de diagnóstico prenatal no invasivo**

El test prenatal no invasivo (TPNI) ha desplazado a las técnicas convencionales en la detección de aneuploidías. Este se basa en el análisis del ADN libre celular circulante que consiste en pequeños fragmentos de ADN en sangre liberados de células de diferentes órganos en varios procesos celulares tales como apoptosis o necrosis. El origen del ADN celular materno es el sistema hematopoyético, mientras que el ADN fetal tiene su origen en el trofoblasto (4).

Éste se realiza mediante la extracción de sangre materna y la recogida de ADN libre celular para posteriormente obtener el ADN celular libre fetal (fracción fetal). La fracción fetal hace referencia al total de ADN libre celular en sangre materna que tiene origen fetoplacentario y se puede calcular restando la contribución materna en el ADN, que se corresponde a un 10-15% (18). La diferenciación entre ADN fetal y materno se realiza gracias a la presencia del haplotipo de polimorfismos de nucleótido único que se encuentran en exceso en la circulación materna.

Este procedimiento no supone riesgo de pérdida fetal y ha incrementado la especificidad y el valor predictivo positivo para la detección de aneuploidías frente a los procedimientos previamente descritos.

Recientemente, se ha implementado dentro de la cartilla de servicios de nuestro Sistema Nacional de Salud la realización de este tipo de técnicas ante un resultado indicativo de riesgo en el Cribado combinado del primer trimestre que consiste en la extracción de sangre materna para el posterior análisis de la porción de ADN fetal y, únicamente, con el objetivo de determinar la presencia de T21, T13 o T18. Así bien, el diagnóstico prenatal que emplea la secuenciación de ADN libre celular ha permitido reducir el número de procedimientos invasivos para el diagnóstico de trastornos genéticos y ha reducido el riesgo asociado a los mismos (19).

Sin embargo, no están establecidas de forma sistemática en el cribado, otras técnicas de diagnóstico genético no invasivas que puedan abarcar un estudio de mayor amplitud genética para otras anomalías genéticas de menor frecuencia.

Existen algunas circunstancias que pueden suponer limitaciones a este estudio como son la presencia de mosaicismos fetales o maternos, la presencia de gemelos evanescentes o tumores maternos, entre otros que conllevarían resultados discordantes (20). En el caso de la presencia de mosaicismos maternos, algunos estudios detectaron que el T13 era el más común y supusieron diferencias significativas de VPP entre T13, T18 y T21 (21).

El estudio TRIDENT-2 analiza la implementación del NIPT de genoma completo en los Países Bajos. Permitió la detección de trisomías 21, 18 y 13 con los siguientes VPP del 96%, 98% y 53% respectivamente, es decir, permitió la detección de T21 y 18 con elevados VPP. La implementación de esta técnica ha reducido el número de pruebas invasivas y se expresa preocupación por el aumento de la ansiedad de los padres ante resultados discordantes (22).

- Estudios genéticos en muestras fetales y asesoramiento

Se debe informar a las pacientes que vayan a ser sometidas a una prueba invasiva sobre la posibilidad de presentar una anomalía fetal (cromosómica o monogénica), así como de las limitaciones de los estudios genéticos que van a realizarse. Así bien, el genetista u obstetra deberá informar sobre la posibilidad de obtener falsos positivos, falsos negativos y resultados no concluyentes (2).

Se exponen a continuación los diferentes tipos de estudios genéticos que se realizan en muestras fetales:

- QF-PCR: cuantifica el número de cromosomas 21, 18, 13, X e Y mediante el estudio de regiones altamente polimórficas del ADN de repeticiones cortas en tándem (STR). Por tanto, es capaz de diagnosticar las aneuploidías y triploidías en estos cromosomas. Se determina en muestra obtenida por pruebas invasivas.
Se trata de una técnica menos precisa que el cariotipo, ya que no permite estudiar la dotación cromosómica completa fetal. Además, no detecta pequeños mosaicismos de cromosomas diferentes a 13, 18, 21, X e Y o anomalías estructurales (2, 23).
Algunos estudios resaltan que podría ser utilizada para evaluar la contaminación de células maternas en tejido fetal y la cigosidad de los gemelos (24).
El resultado de esta prueba conlleva diferentes procedimientos:
 - QF-PCR anómala: se realizará un cariotipo dirigido al asesoramiento genético para futuras gestaciones (sobre todo en T21, T13 y en monosomía X).
 - QF-PCR detecta contaminación materna: se estudian diferentes lavados del cultivo de reserva de la muestra hasta que no se detecte la contaminación y, posteriormente, se realizará extracción de ADN para microarray.
 - QF-PCR con resultado normal: se procede a realizar el microarray (25).
- Cariotipo o estudio citogenético: como hemos expuesto previamente, esta técnica permite el análisis del número y estructura de todos los cromosomas, permitiendo la detección de alteraciones numéricas (aneuploidías y poliploidías) y estructurales de segmentos > 5-10 Mb (translocaciones equilibradas, desequilibradas, deleciones, duplicaciones, inserciones e inversiones) (25).
 - Cariotipo por cultivo corto o método semidirecto en vellosidades coriales: se trata de una técnica que ha sido sustituida por la QF-PCR y permite un cariotipo en un tiempo de 2-7 días. Presenta un riesgo de 2% de resultados no concluyentes debido a anomalías confinadas a la placenta (2).

- Cariotipo por cultivo largo: técnica similar a la anterior con resultado obtenido en 3 semanas. Presenta riesgo de contaminación materna, pero la posibilidad de detección de una anomalía confinada a la placenta es baja y la tasa de falsos negativos es inferior a la del cultivo corto. Se recomienda realizar un cultivo largo tras microarray, QF-PCR o cultivo corto (2).
- FISH: hibridación de secuencias de ADN cromosómicas específicas marcadas con fluorocromos en una preparación cromosómica mediante el uso de sondas específicas correspondientes a los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. La hibridación se realiza con ADN complementario, tanto en células en interfase como en metafase, procedente de muestra de biopsia corial o amniocentesis y puede ser visualizada a través de microscopio. No permite detectar contaminación materna, sin embargo puede detectar o confirmar la presencia de mosaicos (16).

Tabla 3: Resumen comparativo entre las técnicas de QF-PCR y FISH en el diagnóstico genético prenatal.

Características	QF-PCR	FISH
Volumen de muestra requerido	Menor muestra	Mínimo 50 núcleos de interfase para cada cromosoma
Tiempo de análisis	Menor	Mayor
Determinación de contaminación materna	Posible	No es posible
Análisis de STR en sangre materna	Sí	No
Descarta/Confirma mosaicos	No	Sí

Como se recoge en la tabla previa, la técnica de QF-PCR presenta varias ventajas con respecto a FISH, ya que presenta un volumen de muestra requerido menor y su realización comprende un tiempo más reducido de análisis, la determinación de contaminación materna no es posible en FISH y analiza STR de muestra materna y, con ello, diferencia entre picos extras o ratios sesgadas entre alelos. Sin embargo, la FISH tiene la capacidad de descartar o confirmar la presencia de mosaicos analizando un elevado número de células (26).

- Microarray, cariotipo molecular o array: se trata de un análisis cromosómico que permite detectar microdeleciones y microduplicaciones críticas para el cariotipo (<10 Mb), lo que se conoce como CNVs (que hemos nombrado más arriba), es decir submicroscópicas, así como aneuploidías, deleciones y duplicaciones. Es de elección sobre todo ante malformaciones fetales (anomalías fetales detectadas por ecográficas), crecimiento intrauterino restringido (CIR) precoz y TN mayor al percentil 99. Se distinguen dos modalidades: array-CGH (hibridación competitiva equimolar de ADN de un paciente) y array-SNP (hibridación no competitiva). Puede

ser realizada en muestra fetal obtenida por prueba invasiva ya sea biopsia corial, amniocentesis, líquido amniótico o sangre siempre que se contenga el suficiente ADN fetal en dicha muestra (25).

Permite detectar un 6-8% adicional de anomalías genéticas por encima del cariotipo convencional en caso de malformaciones ecográficas.

Esta técnica presenta algunas limitaciones: no es capaz de detectar mutaciones puntuales, expansiones de tripletes, reordenamientos equilibrados ni mosaicismos de baja prevalencia (<2%) o compensados. Sin embargo, a través de la modalidad de array-SNP pueden detectarse triploidías y la presencia de contaminación celular materna. Por eso, en caso de utilizar array-CGH se recomienda la realización de QF-PCR previa (14, 25).

- Secuenciación Sanger: técnica con amplio uso en el diagnóstico genético de enfermedades de etiología molecular dirigida y será indicada en casos con fenotipo muy específico que sugiera etiología en un único gen y, de manera principal, en el estudio prenatal de mutaciones conocidas en padres portadores, pudiendo realizarse en muestra de biopsia de vellosidades coriales o líquido amniótico. Presenta un elevado coste económico y elevado tiempo requerido que deben ser considerados (16).
- Reserva de ADN: se realiza en presencia de un feto con anomalías estructurales detectadas a través de ecografía, pero con microarray con resultado normal y se puede realizar a través de:
 - Panel multigénico dirigido mediante NGS: estudia exones de genes relacionados con patología fetal específica. Las principales ventajas son las de minimizar los resultados incidentales. En el diagnóstico genético prenatal existen tres modelos de panel multigénico:
 - Panel guiado por hallazgos fenotípicos fetales definidos mediante HPO (*human phenotyping ontology*), sin embargo podrían no coincidir con las alteraciones posnatales conduciendo a error.
 - Panel enfocado a una o varias anomalías ecográficas fetales que se asocian a un número variable de genes:
 - Panel de hidrops-RASopatías.
 - Panel de CAKUT (anomalías congénitas del riñón y del tracto urinario): riñones hiperecogénicos o displásicos/poliquísticos cuando se presentan de forma bilateral y en agenesia renal bilateral.
 - Panel de craneosinostosis.
 - Panel de esclerosis tuberosa.
 - Panel de genes del desarrollo: incluye alrededor de 2000 genes relacionados con el desarrollo fetal.

En caso de encontrarse una variante patogénica se deberá segregar en los progenitores mediante secuenciación Sanger para valorar si es *de novo* o heredada (25).

- Exoma Completo: estudia los exones de los genes OMIM (exoma clínico) o de todos los genes (exoma completo) e indica anomalías estructurales y

recurrentes mediante NGS. Se realiza ante las siguientes circunstancias con un rendimiento diagnóstico >20%:

- Anomalías ecográficas fetales recurrentes.
- Anomalías múltiples que afectan a 2 sistemas anatómicos diferentes.
- Displasia esquelética fetal.
- Anomalías complejas del SNC o cuerpo calloso de dimensiones o morfología anormales (25).

Las principales limitaciones de NGS comprenden la detección de variantes de significado incierto que pueden conllevar ansiedad en la familia y dificultad en la toma de decisiones clínicas (26).

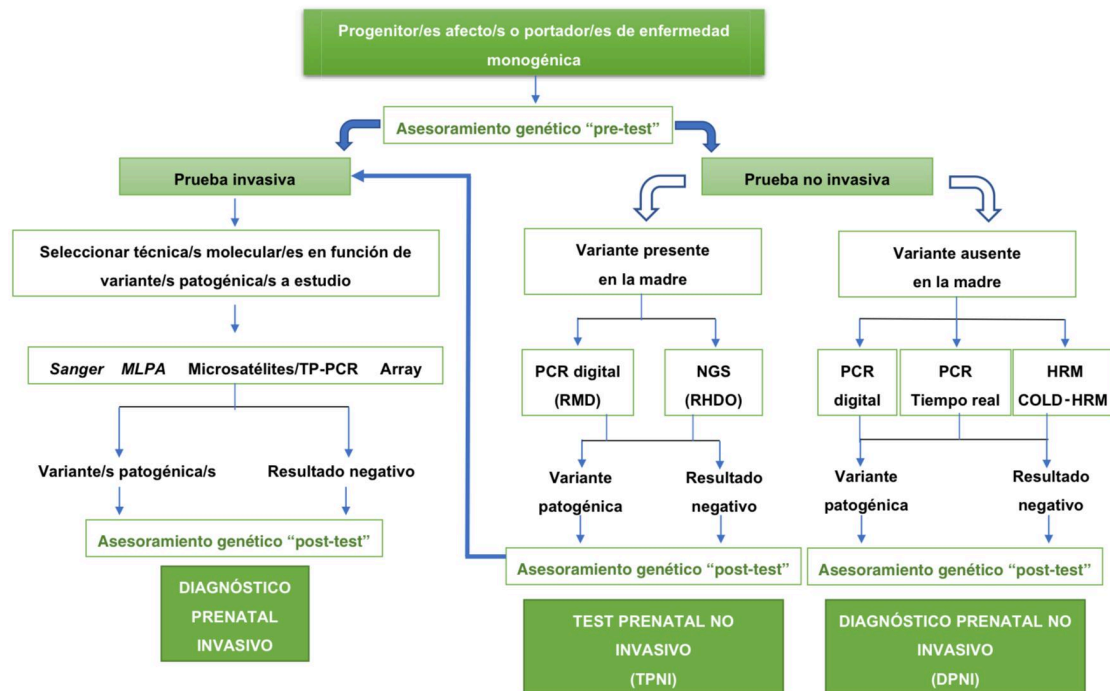
- Los estudios de metilación en genes imprintados relevantes en el desarrollo y diferenciación fetal se realizan mediante la técnica de MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex ligation-dependent probe amplification*) (25).

- Indicaciones para el uso de NGS en el diagnóstico genético prenatal

En la *Guía de Procedimientos NGS aplicados al diagnóstico prenatal de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia y la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal* se resumen las indicaciones clínicas en el ámbito prenatal y se ofrecen recomendaciones actualizadas para el uso de estas pruebas diagnósticas. Se concluye que las pruebas de NGS pueden aumentar la capacidad de diagnóstico de anomalías fetales, pero además presentan desafíos relacionados con la interpretación de resultados y el asesoramiento genético. Las indicaciones clínicas para el uso de pruebas de NGS incluyen:

1. Anomalías estructurales fetales: se recomienda el uso de este tipo de pruebas ante la detección de una o varias anomalías estructurales durante la ecografía que sugieran origen monogénico. Se establece un umbral de rendimiento esperado del 20% aunque no está reconocido formalmente.
2. Otras anomalías con rendimiento diagnóstico incrementado: es posible considerar anomalías con un rendimiento diagnóstico superior al 10% para la realización de pruebas de NGS.
3. Falta de alteraciones genéticas: se aplica NGS en situaciones donde no se han identificado alteraciones genéticas mediante análisis convencionales como QF-PCR o análisis de microarrays cromosómicos.
4. Sospecha de anomalías monogénicas: en situaciones de alta sospecha de recurrencia basada en la historia familiar se recomienda el uso de NGS, incluso en caso de que no se hayan realizado estudios genéticos previos tanto prenatales como posnatales.

Imagen 2: Algoritmo de actuación ante progenitores afectados o portadores de una enfermedad monogénica.



Algoritmo diagnóstico para descartar una enfermedad monogénica en feto en el que uno de los progenitores o ambos son afectados o portadores de una enfermedad monogénica. ARMS, amplification-refractory mutation system (sistema de mutación refractaria a la amplificación); HRM, high resolution melting (fusión de alta resolución); MLPA, multiplex ligation probe amplification (amplificación de sonda de ligadura múltiple); NIPD, non invasive prenatal diagnosis (diagnóstico prenatal no invasivo); NIPT, non invasive prenatal test (test prenatal no invasivo); RHDO, relative haplotype dosage analysis (análisis de dosis relativa de haplotipos); RMD, relative mutation dosage (dosis relativa de mutación); TP-PCR, triplet repeat primed PCR (PCR cebada con repetición de tripletes) (4). A partir del siguiente esquema queda sintetizado el manejo del diagnóstico prenatal de anomalías genéticas en caso de enfermedad monogénica conocida en uno o ambos progenitores y mediante qué tipo de técnicas diagnósticas genéticas se realiza bien sea a través de pruebas invasivas o no invasivas.

5. Enfoque de diagnóstico específico: en algunas situaciones, si existe un enfoque diagnóstico específico donde las SNVs son más prevalentes que las CNVs, se puede sugerir este tipo de prueba mediante NGS como primera línea.
6. Pruebas de carga genética familiar: puede ser recomendable el uso de NGS en embarazos con alta sospecha de recurrencia si no se han realizado estudios genéticos apropiados con anterioridad o ante la ausencia de muestras disponibles.

Además, en este documento se enfatiza en la necesidad de establecer algunas directrices nacionales para el uso de estas pruebas y se promueve la revisión de forma periódica de las recomendaciones a medida que se avance en el conocimiento sobre la aplicabilidad clínica de estas técnicas (27).

- Recientes investigaciones

Los TPNI no solo permiten detectar anomalías cromosómicas en fetos, sino que también generan grandes cantidades de datos de secuenciación de ultra-baja profundidad que pueden ser aprovechados en estudios genómicos poblacionales, como hemos nombrado previamente. Algunos autores han sintetizado un protocolo generalizado aplicable a una gran gama de estudios de secuenciación de ultra baja profundidad que se convierte en una herramienta de gran utilidad para investigadores en genómica poblacional (28).

Una Revisión Sistemática y Metaanálisis establece que TPNI a través del ADN libre celular es el método con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de síndrome de Down fetal, trisomía de cromosoma 13 y 18 en embarazos tanto simples como gemelares. Además, el ADN libre celular puede detectar aneuploidías maternas y malignidad dificultando el asesoramiento del paciente. Sin embargo, su uso en la detección de trisomías autosómicas raras, aneuploidías de cromosomas sexuales y en variaciones del número de copias en práctica clínica es más limitada, ya que se requieren más estudios que valoren su valor predictivo y sigan un control sistemático de los resultados clínicos (31).

- Tecnologías Complementarias

El *Proyecto GDSCREENING* tiene el objetivo de desarrollar un TPNI que detecte 32 trastornos genéticos mediante el uso de secuenciación de fragmentos largos, inteligencia artificial y tecnología blockchain con el objetivo de fomentar mejoras en la precisión y eficiencia del diagnóstico prenatal. Esto incluiría la detección de S. Down, Edwards y Patau, así como de anomalías en cromosomas sexuales y microdelecciones, superando las limitaciones de las tecnologías actuales (30).

RESULTADOS

Debido a que los datos son cualitativos y el objetivo es el de valorar la eficacia de la prueba de NGS, se realizan tablas de contingencia que relacionan los resultados del TPNI, valorándose si la prueba detectó mutación o, por el contrario, no lo hace, frente a hallazgos ecográficos (malformaciones fetales).

Tabla 4. Hallazgos ecográficos encontrados.

Hallazgos patológicos ecográficos	Nº de pacientes
ARSA	11
Ectasia piélica renal izquierda	4
Quiste de cordón	1
Seno yugular unilateral izquierdo	1
PVUD	1
Agenesia renal derecha	1
Insuficiencia tricuspídea pansistólica	1
TN >p99	1
Pelvis renal derecha bífida	1
Onfalocele	1
QPC	7
FOCI	1
Riñón en herradura (sospecha)	1

En la presente tabla se recogen las diferentes anomalías detectadas mediante ecografía y que fueron consideradas como patológicas y, a su lado, el número de pacientes que las presentaban. Cabe destacar que algunos pacientes presentaban algunas de esas malformaciones de forma conjunta. Además, debemos recordar (como he explicado previamente) que la detección de QPC de forma aislada puede ser tan solo una variante de la normalidad, al igual que otros hallazgos de marcadores de manera aislada y sin etiología monogénica. Por otro lado, cabe recordar que las aneuploidías, los reordenamientos cromosómicos estructurales y las CNVs se asocian con hasta el 40% de las malformaciones congénitas (10).

Tabla 5. Validez diagnóstica:

Tabla de validez diagnóstica	Resultados Ecográficos (Confirman o No)		
TPNI (NGS)	SÍ (ENFERMO)	NO (SANO)	TOTAL
Alto riesgo	4	4	8
Bajo riesgo	29	318	347
TOTAL	33	322	355

Sensibilidad	0,12
Especificidad	0,01
VPP	0,50
VPN	0,92

En esta tabla de validez diagnóstica se ha realizado la valoración de la capacidad de la prueba de TPNI para detectar los hallazgos ecográficos, es decir, la capacidad de que, en caso de que la prueba haya detectado alto riesgo, se encuentre una anomalía ecográfica que pueda ser la responsable por correlacionarse con un síndrome fetal (fundamentalmente una aneuploidía).

Como resultado obtenido de la tabla de validez diagnóstica se obtuvieron datos muy poco satisfactorios en cuanto a la validez intrínseca de la prueba. Esto se debe a que se trató de valorar la capacidad de la prueba de diagnóstico para detectar esas alteraciones morfológicas, siendo en su mayoría alteraciones aisladas y, aunque pueden estar asociadas a un síndrome fetal, de manera aislada, pueden no suponer siempre la existencia de una aneuploidía. Por este motivo, podemos concluir que, en caso de alteraciones fetales morfológicas (aisladas), la ecografía seguirá siendo superior a una prueba de diagnóstico genético. Sin embargo, se puede comprobar un alto VPN de la prueba (92%) que indica que un resultado negativo en NGS es confiable para descartar enfermedad visualizada ecográficamente.

Por otro lado, en base a los datos disponibles, decidimos realizar un estudio de asociación entre el riesgo inicial y el resultado de la prueba de diagnóstico genético, a través de TPNI, considerando que se hubiese realizado NGS, para determinar si el nivel de riesgo del cribado combinado influía de forma significativa en el resultado del TPNI a nivel de la práctica clínica.

Tabla 6: Correlación entre resultado del cribado y el resultado del TPNI para el cálculo del Chi-cuadrado:

OBSERVADO	Cribado Combinado del primer trimestre		
TPNI (NGS)	Alto riesgo	No alto riesgo*	TOTAL
Alto riesgo	1	2	3
Bajo riesgo	2	106	108
TOTAL	3	108	111
	0,03	0,97	

ESPERADO	Cribado Combinado del primer trimestre		
TPNI (NGS)	Alto riesgo	No alto riesgo *	TOTAL
Alto riesgo	0,08	2,92	3,00
Bajo riesgo	2,92	105,08	108,00
TOTAL	3	108	111,00

Cálculo de fórmula	Cribado Combinado del primer trimestre		
TPNI (NGS)	Alto riesgo	No alto riesgo *	TOTAL
Alto riesgo	10,41	0,29	
Bajo riesgo	0,29	0,01	
TOTAL	10,70	0,30	11,00

**Los que aparecen como “No alto riesgo” hacen referencia a los pacientes con riesgo bajo e intermedio. Grado de libertad (df) = (2-1)(2-1) = 1.*

El resultado del Chi-cuadrado fue de $\chi^2 = 11,17$, con 1 grado de libertad (df = 1). El valor de p fue de 0,00084 y, por tanto, $< 0,05$ (nivel de significación convencional), por lo que se vieron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado del cribado y el resultado de la prueba de NGS posterior y se rechaza la hipótesis nula de independencia entre las variables (H_0). Y, con estos datos, podemos afirmar que hay una asociación significativa entre estos valores y, por tanto, concluimos que el Cribado Combinado del primer trimestre es importante porque supone implicaciones en la toma de decisiones clínicas y en la interpretación de las pruebas prenatales.

Además, se calculó el coeficiente Phi ϕ de aproximadamente 0,317 que explica una asociación de fuerza moderada (entre 0,3 y 0,5) entre el resultado de ambas variables.

DISCUSIÓN

Algunos autores analizaron la técnica de TPNI y obtuvieron que los valores predictivos positivos (VPP) para las trisomías 21, 13 y 18 eran del 91,67%, 66,67% y 100%, respectivamente. No obstante, hubo casos de falsos positivos, especialmente en los casos de anomalías de los cromosomas sexuales (29).

En un estudio retrospectivo que evaluó la eficacia del TPNI para la detección de trisomías 21, 18 y 13, se obtuvieron datos para la T21 de sensibilidad del 100%, de especificidad del 99,50%, VPP del 98,26% y VPN del 100%. Para la T18 la sensibilidad de la prueba fue del 100%, especificidad del 91,67%, el VPP del 91,67% y el VPN del 100%. Y para la T13, los resultados de sensibilidad de la prueba fueron del 100%, de especificidad del 97,47, VPP del 57,14% y VPN del 100% (32).

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio, hay que destacar las reducidas cifras de especificidad, sensibilidad y VPP que no se correlacionan con las de estudios anteriores. En este sentido, cabe destacar la existencia de limitaciones en cuanto a la disponibilidad de los datos solicitados que condujo a un análisis de la capacidad para detectar hallazgos ecográficos y no de las aneuploidías per se. Sin embargo, las cifras del VPN que se han obtenido mediante el presente estudio son bastante similares a las obtenidas en estudios anteriores lo que refuerza el hecho que he comentado de que un resultado negativo en NGS es confiable para descartar enfermedad.

Otro hecho destacable es que, de todos los pacientes con cribado de riesgo intermedio o alto en el cribado combinado del primer trimestre que no presentaban alteraciones ecográficas (en los datos de los que disponía), tenían prueba de TPNI negativa (de bajo riesgo). Esto puede indicar un importante valor de los datos ecográficos en la determinación del resultado de esta prueba. Este hecho puede reafirmar que el que se haya trabajado con hallazgos ecográficos en vez de con hallazgos genéticos (por no disponerse de los mismos) haya podido conseguir un resultado relevante en el estudio.

Sobre todo, hay que destacar la utilidad clínica de los hallazgos ecográficos aislados, ya que muchos embarazos presentan este tipo de hallazgos, y la decisión posterior de realizar pruebas invasivas se basa en un juicio clínico que puede beneficiarse de más datos sobre rendimiento de la prueba (33).

Por otro lado, se constata el hecho de que el cribado combinado tiene una gran relevancia en el resultado del TPNI posterior y posiblemente podría intervenir positivamente en el mantenimiento de la eficiencia de los protocolos empleados hoy en día en muchos hospitales a través de este método de screening.

Ante todo, aunque los avances en tecnología y la precisión de esta técnica ofrecen grandes ventajas, los autores subrayan que la implementación generalizada de estas pruebas requiere una mayor educación médica y establecer una guía para su aplicación correcta en la práctica clínica diaria (29).

En nuestro estudio, se realizó la petición de datos a través de la plataforma BIGAN de IACS, por lo que se obtuvieron datos de todas las mujeres embarazadas que en los años 2023 y 2024 se habían realizado pruebas de Cribado Combinado del primer o segundo trimestre

con resultado alterado y con posterior realización de una prueba invasiva y/o TPNI. Sin embargo, debido a que se solicitaron datos pseudonimizados y, a través de la plataforma mencionada, algunos datos no aparecían reflejados y solo se pudieron recoger los datos que sí quedaban reflejados y el tamaño de muestra quedó bastante reducido. De esta manera, siendo el tamaño inicial de 52.226 consultas de gestantes (algunas procedentes de las mismas mujeres), posteriormente este quedó limitado a 354 mujeres.

Por este motivo, debimos modificar el planteamiento del estudio y, a pesar de que “originalmente” el objetivo era realizar un estudio comparativo entre NGS y otras pruebas de diagnóstico genético, posteriormente el estudio se dirigió más a valorar la validez diagnóstica de la prueba.

Por otro lado, no fue posible conocer qué tipo de técnica de diagnóstico genético concreta se habían realizado las gestantes, ya que no se disponía de estos datos. De esta manera, asumimos que las pacientes a las que se les había realizado TPNI, el estudio genético se había obtenido mediante NGS. Por otro lado, asumimos que las mujeres a las que se les había realizado una prueba invasiva, las muestras no habrían sido analizadas mediante NGS, sino mediante otras técnicas de diagnóstico genético (arrays,...).

Además, según los datos obtenidos no ha sido posible conocer si hay confirmación de las aneuploidías principales, en caso de presentarlas, ni de qué tipo de aneuploidía se sospechaba. Cabe recordar que el TPNI es una técnica de cribado cuyo riesgo en caso de ser elevado debe confirmarse con una técnica invasiva posterior y en nuestros datos, no quedaba reflejado ese resultado. De la misma forma, en los datos de los que disponíamos, las mujeres en las que se reflejaba que habían sido sometidas a una prueba invasiva, presentaban un resultado negativo para la detección de aneuploidías en su totalidad o así quedaba reflejado.

A su vez, no pudimos realizar las mismas tablas de validez diagnóstica correlacionando los resultados ecográficos con los de la prueba invasiva porque no aparecían datos de confirmación de aneuploidía mediante prueba invasiva.

Me gustaría destacar que, estos datos son pseudonimizados y aportados por la plataforma BIGAN, como he comentado previamente, y, en caso de necesidad de obtención de los mismos, podría solicitar su permiso para otra futura investigación posterior o necesidad de disposición de estos.

CONCLUSIONES

1. El estudio del ADN fetal en sangre materna a través de TPNI en el contexto de malformaciones fetales detectadas mediante ecografía o ante el resultado del Cribado Combinado del primer trimestre con un resultado de riesgo intermedio ha disminuido de forma significativa el número de pruebas invasivas en mujeres con la consecuente reducción del riesgo asociado a las mismas, como es la tasa de abortos espontáneos, así como la reducción de la ansiedad en los progenitores. Sin embargo, en los casos de resultado de alto riesgo de aneuploidías se requiere una confirmación con un test invasivo debido a que este tipo de técnicas no detectan poliploidías, además, en casos de restricción del crecimiento del trofoblasto o desarrollo anormal de la placenta podría dar como resultado baja fracción de ADN fetal con consecuente test con resultado no fiable.
2. Aunque este estudio no tuvo confirmación genética de las anomalías sospechadas, los resultados ecográficos permitieron una aproximación indirecta de la validez del TPNI mediante NGS. Sin embargo, debido a la naturaleza inespecífica de algunos marcadores, los resultados deben interpretarse de manera cuidadosa. Estos hallazgos resaltan la importancia de reunir múltiples fuentes de información clínica al evaluar el riesgo fetal y refuerzan la necesidad de estudios futuros que incluyan una confirmación genética para valorar con mayor precisión la utilidad clínica del TPNI en contexto de hallazgos ecográficos sugestivos.
3. Los resultados del TPNI pueden ser de utilidad para orientar la toma de decisiones clínicas en situaciones donde no se desea o no es posible realizar pruebas invasivas.
4. Mediante la realización del análisis de los datos corroboramos que el Cribado Combinado del primer trimestre es relevante porque supone implicaciones en la toma de decisiones clínicas y en la interpretación de las pruebas prenatales. Además, todas las pacientes con cribado de riesgo intermedio o alto en el primer trimestre que no presentaban alteraciones ecográficas en nuestros datos, tenían un resultado de la prueba de TPNI negativa, por lo que se puede intuir un importante valor de los datos ecográficos en la determinación del resultado del cribado.
5. Conseguir un adecuado diagnóstico en la vida fetal puede mejorar la atención clínica en el asesoramiento de los embarazos, así como de favorecer la toma de decisiones en la elección de terapias o decisión por parte de los padres en cuanto a la interrupción del embarazo.
6. Se prevé un futuro prometedor en la medicina fetal con la evolución y el constante desarrollo de las pruebas de NGS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. Medical Genetics. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
2. García-Posada R, Borobio V, Bennasar M, Illa M, Mula R, Serés A, et al. Biopsia corial transcervical: guía práctica. Diagnóstico Prenat [Internet]. 2012 Jan;23(1):2–10. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-diagnostico-prenatal-327-articulo-biopsia-corial-transcervical-guia-practica-S2173412711001089>
3. Rodríguez PD. Utilidad del ADN fetal en sangre materna para el cribado neonatal. FMC - Form Médica Contin en Atención Primaria [Internet]. 2020 Oct;27(8):411–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1134207220301134>
4. Borrel Vilaseca A, Gil Mira M del M, Molina García F, Plasencia Acevedo W, Santa Cruz Martín B. Técnicas invasivas en diagnóstico prenatal. Guía de Asistencia Práctica de la Sección de Ecografía Obstétrico-Ginecológica de la SEGO. 2022;1–51.
5. Genomics Education Programme. Long-read sequencing: the next next generation? [Internet]. Birmingham: Health Education England; 2019 Sept 10. Available from: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/blog/the-next-next-generation-long-read-sequencing/>
6. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology. 2023;12(7):997. Available from:doi:<https://doi.org/10.3390/biology12070997>
7. Mandlik JS, Patil AS, Singh S. Next-Generation Sequencing (NGS): Platforms and Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2024;16 (Suppl 1): S41-S45. Available from :https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_838_23
8. Prior-de Castro C, Gómez-González C, Rodríguez-López R, Macher HC. Diagnóstico genético prenatal de enfermedades monogénicas. Laboratorio médico avanzado. 2023. doi: 10.1515/ almed-2022-0086.
9. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. Diagnóstico Prenatal. 2012; 23(2):56-66. doi: 10.1016/j.diapre.2012.02.001.
10. Pritchard DJ, Korf BR. Genética Médica: lo esencial de un vistazo. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015. 232 p.
11. Arenas Ramírez J, Puerto Navarro B, Antolín Alvarado E, Sainz Bueno JA, Herrero Ruiz B, Borrero González C. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Guías de Asistencia Práctica: Guía de la exploración ecográfica del III trimestre; 2020 [Internet]. Disponible en: https://sego.es/Guias_de_Asistencia_Practica#ecografia.
12. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Guía sistemática de la exploración ecográfica del segundo trimestre. Prog Obstet Ginecol. 2020;63(2):123-134. Disponible en: <https://sego.es/documentos/progresos/v63-2020/n2/GAP-exploracon%20eco%202%20trimestre%20act%202019.pdf>
13. Emms A, Castleman J, Allen S, Williams D, Kinning E, Kilby M. Next Generation Sequencing after Invasive Prenatal Testing in Fetuses with Congenital Malformations: Prenatal or Neonatal Investigation. *Genes (Basel)*. 2022; 13(9):1517. doi:10.3390/genes13091517.

14. Adiego B, Antolín E, Arenas J, Carreras E, Comas C, Delgado JL, et al. Cribado y diagnóstico precoz de anomalías genéticas. *Progresos Obstet y Ginecol*. 2018;61(6):605–29.
15. Spanish Society of Gynecology and Obstetrics. Prenatal control of normal pregnancy Protocol updated in May 2017 [Control Prenatal del embarazo normal Protocolo actualizado en Mayo de 2017]. 2017;1–26. Available from: <https://cgomedic.com/wp-content/uploads/2017/10/Nuevo-Protocolo-Embarazo-Normal-SEGO.pdf>. Published 2017. Accedido agosto 1, 2018.
16. Ciortea R, Malutan AM, Bucuri CE, Berceanu C, Rada MP, Ormindean CM, et al. Amniocentesis—When It Is Clear That It Is Not Clear. *J Clin Med* [Internet]. 2023 Jan 6;12(2):454. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/12/2/454>
17. Carrasco Salas P, Gómez González C, Prior de Castro C, Cuesta Peredo A, Santamaría González M, Granell Escobar R, et al. Estudios genéticos en diagnóstico prenatal. Recomendación (2018). *Rev Laboratorio Clín*. 2019;12(1):27-37. doi: 10.1016/j.labcli.2018.10.001.
18. Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn* [Internet]. 2020 Jan 10;40(2):155–63. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.5620>.
19. Moufarrej MN, Bianchi DW, Shaw GM, Stevenson DK, Quake SR. Noninvasive Prenatal Testing Using Circulating DNA and RNA: Advances, Challenges, and Possibilities. *Annu Rev Biomed Data Sci* [Internet]. 2023 Aug 10;6(1):397–418. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biodatasci-020722-094144>
20. Madrigal Bajo I, Jodar Bifet M, Badenas Orquin C. Implementación del ADN libre circulante para la detección de aneuploidías fetales. *Adv Lab Med*. 2025. <https://doi.org/10.1515/almed-2024-0110>
21. Rafalko JM, Caldwell S, Tynan J, Almasri E, Weinblatt V, McCullough R. Impact of mosaicism ratio on positive predictive value of cfDNA screening. *Prenat Diagn* 2021;41:28–34.
22. Sistermans EA, Schuring-Blom H, Sikkel EC, Sikkeman-Raddatz B, Smeets DFMC, Srebniak MI, et al. The TRIDENT-2 study: implementation of non-invasive prenatal testing (NIPT) as a first-tier screening test in the Netherlands. *Am J Hum Genet*. 2019;105(6):1091-1101. doi:10.1016/j.ajhg.2019.10.005.
23. Romero A, Beltrán C. Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales [Internet]. Aetsa. 2015. 1–90 p. Available from: https://www.aetsa.org/download/5_AETSA_Utilidad-de-QF_PCR-en-el-diagnostico-prenatal-de-aneuploidias-feta DEF NIPO.pdf
24. Hoi Kin Chau M, Choolani M, Dong Z, Cao Y, Choy KW. Genome sequencing in the prenatal diagnosis of structural malformations in the fetus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2024; 97:102539. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2024.102539.
25. Javier A, Ramírez A, Navarro BP, Navidad MÁ, Vilaseca AB, Navidad Á, et al. Anomalías estructurales fetales. Proceso diagnóstico. *Prog Obs Ginecol*. 2024;67:151–76. Available from: <https://sego.es/documentos/progresos/v67-2024/n4/03%20Anomal%C3%ADas%20estructurales%20fetales.%20Proceso%20diagn%C3%B3stico.pdf>

26. Cabra-Rodríguez R, Bueno Rodríguez G, Santos Rosa C, Castaño López MÁ, Delgado Muñoz S, León-Justel A. Valoración de un cambio de protocolo del cribado prenatal mediante la inclusión del diagnóstico prenatal no invasivo. *Adv Lab Med*. 2020 Apr 7;1(2):20190020. doi: 10.1515/almed-2019-0020. PMCID: PMC10158734.
27. Abulí A, Antolín E, Borrell A, García-Hoyos M, García Santiago F, Gómez Manjón I, et al. Guía de procedimientos de NGS aplicada al diagnóstico prenatal por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia y la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal. *J Med Genet*. 2024;61(8): 727-33. doi: 10.1136/jmg-2024-109878. PMID: 38834294.
28. Zeng J, Li L, Lin Y, Lan X, Zhang X, Whang Y, et al. Protocol for genetic analysis of population-scale ultra-low-depth sequencing data. *STAR Protoc*. 2025; 6: 103579.
29. Qi-Ge Q, Tuo Y, Liu L-X, Yu C-X, Wu A-N. Pruebas prenatales de ADN (NIPT) basadas en la amniocentesis y la secuenciación de próxima generación (NGS) para el diagnóstico prenatal de los trastornos cromosómicos fetales. *Rev Int Med Gen*. 2021; 14:1807-14. doi:10.2147/IJGM.S297585.
30. Congen. Proyecto GDSCREENING. [Internet]. Madrid: Congen; 2024 [citado 30 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.congen.es/investigacion/proyecto-gdscreening/>
31. Rose NC, Barrie ES, Malinowski J, Jenkins GP, McClain MR, LaGrave D, et al. ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Systematic evidence-based review: The application of noninvasive prenatal screening using cell-free DNA in general-risk pregnancies. *Genet Med*. 2022 Jul; 24 (7): 1379-91. doi:10.1016/j.gim.2022.03.019. PMID: 35608568.
32. Zhang Y, Xu H, Zhang W, Liu K. Non-invasive prenatal testing for the detection of trisomy 13, 18 and 21 and sex chromosome aneuploidies in 68,763 cases. *Front Genet*. 2022; 13:864076.doi:10.3389/fgene.2022.864076.
33. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, Kagan KO, Paladini D, Yeo G, et al; ISUOG Clinical Standards Committee. ISUOG updated consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017 Jun;49(6):815-6.