



# GRADO EN MEDICINA

## TRABAJO FIN DE GRADO

### NUEVOS AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

New advances in prenatal  
diagnosis of genetic diseases

**Autor/a:** D. <sup>ª</sup> ANA CUEVAS BURÓN

**Director/es:** D. <sup>ª</sup> MARÍA ELENA CABEZÓN NAVARRO

**Santander, Junio, 2024**

## **RESUMEN**

**Objetivo:** Conocer los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad para la detección prenatal de anomalías genéticas, sus ventajas, limitaciones, aplicaciones y perspectiva futura.

**Metodología:** revisión narrativa mediante búsqueda bibliográfica en bases de datos como Pubmed, editoriales y libros científicos.

**Resultados:** análisis de la información de diferentes libros y artículos obteniendo temas comunes y relevantes en relación con este estudio: 1. Tipos de anomalías genéticas. 2. Cribado poblacional actual 3. Técnicas invasivas y no invasivas.

**Conclusiones:** actualmente la disponibilidad de pruebas para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas es muy amplia. Aquellas pruebas consideradas no invasivas aún son un método de cribado que precisa confirmación posterior mediante pruebas invasivas. Los avances logrados en los últimos años han aumentado la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de éstas. La técnica de mapeo óptico del genoma es la más novedosa, detectando alteraciones cromosómicas de más de 500 pares de bases. Su principal inconveniente es la obtención de la muestra de forma invasiva, con los riesgos asociados. Siguen existiendo limitaciones importantes.

**Palabras clave:** Cribado combinado del primer trimestre. Análisis de ADN fetal en sangre materna. Diagnóstico prenatal no invasivo. Diagnóstico prenatal invasivo. Cariotipo por cultivo. FISH. QF-PCR. Microarray. NGS. Mapeo óptico del genoma.

## **ABSTRACT**

**Objective:** to learn about the assistance offered by the Spanish Public Health System on prenatal diagnosis for the detection of genetic anomalies, the advantages, limitations, applications; as well as its future perspective

**Methodology:** narrative review through bibliographic search in databases such as PubMed, publishers and scientific books.

**Results:** An analysis of the information obtained from the different books and articles is carried out, obtaining the common and relevant themes 1. Types of genetic anomalies and their classification. 2. Current population screening 3. Invasive and non-invasive techniques

**Conclusions:** The availability of tests for the diagnosis of chromosomal anomalies is very wide. Those tests considered non-invasive, are still a screening method that requires subsequent confirmation through invasive tests. The advances made in recent years have increased their sensitivity, specificity and predictive values. The optical mapping technique of the genome is the most innovative, detecting chromosomal alterations of more than 500 base pairs. Its main drawback is obtaining the sample invasively with the associated risks. Important limitations remain.

**Keywords:** Combined first trimester screening. Analysis of fetal DNA in maternal blood. Non-invasive prenatal diagnosis. Invasive prenatal diagnosis. Karyotype by culture. FISH. QF-PCR. Microarray. NGS/Next Generation Sequencing. Optical genome mapping

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <u>TIPOS DE ENFERMEDADES O TRASTORNOS GENÉTICOS</u> .....	1
1.1.1. Anomalías cromosómicas: anomalías numéricas y estructurales .....	1
1.1.2. Enfermedades monogénicas .....	10
1.1.3. Enfermedades de carácter multifactorial .....	13
1.2. <u>INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA Y PATERNA EN LA APARICIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS</u> .....	13
<b>2. OBJETIVO</b> .....	16
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ANÁLISIS DE LAS TÉCNICAS DISPONIBLES EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL</b> .....	17
4.1. <u>TÉCNICAS DE ANÁLISIS NO INVASIVAS</u> .....	17
4.1.1. Cribado combinado del primer trimestre .....	17
4.1.2. Análisis de ADN fetal en sangre materna .....	19
4.2. <u>TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUE REQUIEREN PRUEBAS INVASIVAS</u> .....	29
4.2.1. Cariotipo por cultivo .....	30
4.2.2. FISH .....	31
4.2.3. QF-PCR .....	32
4.2.4. Microarray .....	33
4.2.5. NGS/Next Generation Sequencing .....	36
4.2.6. Mapeo óptico del genoma .....	38
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	42
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>7. AGRADECIMIENTOS</b>	

## 1. INTRODUCCIÓN

El genoma humano haploide (ADN) se compone de una secuencia de nucleótidos (aproximadamente  $3.2 \times 10^9$  pb) que se disponen compactados en 23 pares de cromosomas (22 autosomas y 2 cromosomas sexuales). Cada célula posee su propio ADN, es decir, su copia del genoma humano, la cual contiene aproximadamente 25000 genes.

Los conocimientos disponibles acerca de la naturaleza y la identidad de nuestros genes, además de la composición del genoma humano, han aumentado de manera exponencial durante los últimos años. En el año 1990 se pone en marcha lo que conocemos como “Proyecto Genoma Humano”, cuyo objetivo se basa en la obtención de la secuencia completa de ADN de los seres humanos, el cual se completa casi en su totalidad en el año 2003 (1). No obstante, debido a numerosas limitaciones técnicas (sobre todo la dificultad para la identificación de las regiones repetitivas), no es hasta marzo del 2022 cuando se publica el primer genoma humano completo (2). Los grandes avances en secuenciación por nanoporos permitieron en ese momento obtener secuencias de lectura larga que posibilitaron el ensamblaje de grandes regiones repetitivas.

El objetivo con esta secuenciación es entender la organización funcional de nuestro material genético y la regulación de su expresión (3). Sin embargo, a pesar de conocer la secuencia completa, aún existen importantes limitaciones, ya que un genoma completo no contiene todas las variantes presentes en la población. No obstante, su conocimiento está permitiendo anotar multitud de variantes asociadas a enfermedades genéticas que darán lugar a importantes aplicaciones en diferentes ámbitos, entre ellos, uno de los más importantes es el diagnóstico prenatal.

El diagnóstico prenatal consiste en la detección de un defecto congénito o anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente en el feto (aunque la manifestación pueda ser más tardía). Una parte muy importante de estas anomalías tiene un origen genético, de ahí la importancia de contar con herramientas que nos permitan una detección precoz de las mismas (4).

### 1.1. TIPOS DE ENFERMEDADES O TRASTORNOS GENÉTICOS

#### 1.1.1. Anomalías cromosómicas: anomalías numéricas y anomalías estructurales

Las anomalías cromosómicas pueden afectar a los autosomas, a los cromosomas sexuales o a ambos de forma simultánea.

#### ANOMALÍAS NUMÉRICAS

Dentro de este grupo de anomalías podemos encontrar variaciones en el número total del set de cromosomas (más de dos juegos cromosómicos). Se denominan **POLIPLOIDIAS**. Las más frecuentes son las triploidías y tetraploidías completas, pero ninguna de ellas es compatible con la vida, produciendo la muerte incluso antes del nacimiento.

En el caso de las triploidías, la fecundación de un mismo óvulo por dos espermatozoides constituye su origen más habitual, lo que se conoce como dispermia. No obstante, procesos de endoreduplicación en el ovocito o el espermatocito primario antes de entrar en el proceso de meiosis pueden originar un óvulo o espermatozoide diploide, dando lugar a un embrión triploide ( $3n$ ) tras su unión con el gameto procedente del otro progenitor.

El origen de la tetraploidía radica en un proceso de endoreduplicación en el cigoto recién formado. La célula no se divide, pero el ADN sí se replica, por lo que el organismo resultante será tetraploide ( $4n$ ).

El otro gran grupo de anomalías numéricas lo constituyen las **ANEUPLOIDÍAS**. Implican un número de cromosomas mayor o menor de 46. La etiología de estas anomalías se debe a la pérdida de cromosomas asociada a procesos de no disyunción durante la mitosis o meiosis. Esto implica una alteración de la dosis génica de los individuos, manifestándose en anomalías fenotípicas. El proceso de no disyunción ocurre cuando un par de cromosomas homólogos migran al mismo polo celular. Teniendo en cuenta que “ $n$ ” representa el conjunto haploide de cromosomas, si un gameto que posee un cromosoma extra se une a otro gameto con un contenido cromosómico normal, el resultado será una **trisomía** ( $2n+1$ ); si por el contrario uno de los gametos posee un cromosoma menos, el resultado será una **monosomía** ( $2n-1$ ).

Las aneuploidías se pueden clasificar en función del tipo de cromosoma afectado (**autosomopatías** si afectan a cromosomas autosómicos o **gonosomopatías** si afectan a cromosomas sexuales) o bien atendiendo al número de cromosomas. En cuanto a los tipos de aneuploidías que se observan en nuestra especie, según el número de cromosomas perdidos o adicionales destacamos:

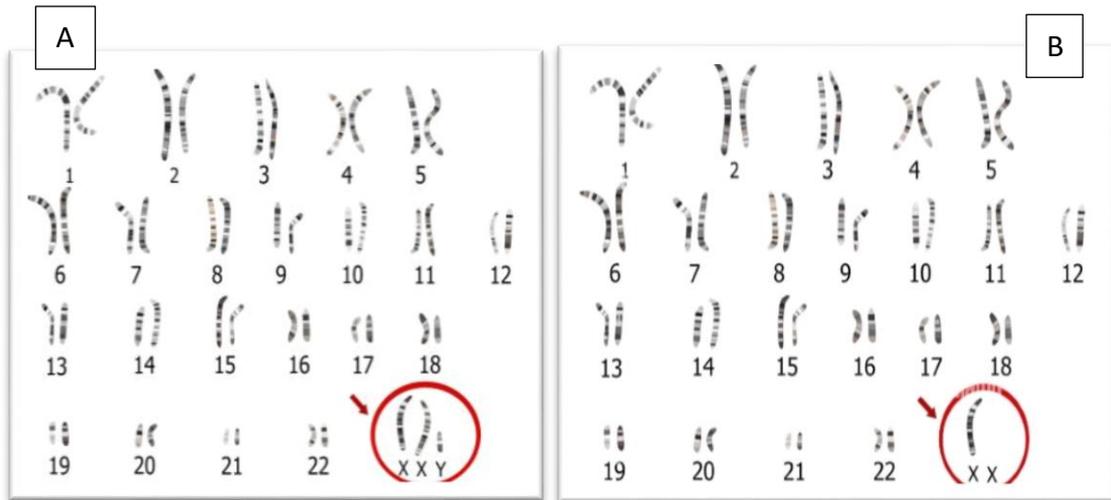
- **Monosomía:** Hace referencia a la pérdida de un cromosoma en un par de homólogos ( $2n-1$ ). La dotación genética sería de 45 cromosomas. La monosomía en autosomas no es viable.
- **Trisomía:** En estos casos existe un cromosoma extra en un par de homólogos, lo que se traduce en la presencia de tres copias de un mismo cromosoma ( $2n+1$ ). El número total de cromosomas es de 47.
- **Tetrasomía:** Existencia de un par extra completo de cromosomas homólogos ( $2n+2$ ), es decir, cuatro copias de un mismo cromosoma. El resultado es la presencia de 48 cromosomas (2).

Las aneuploidías más frecuentes en nuestra especie son:

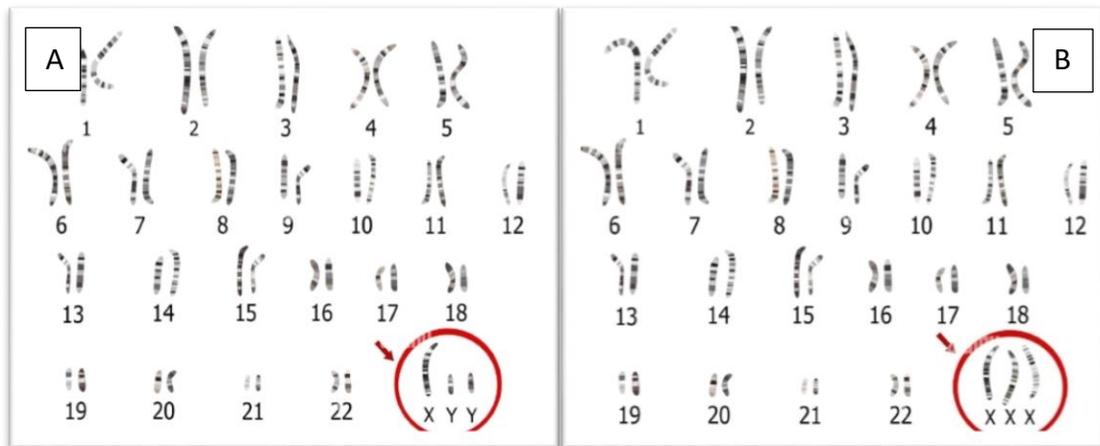
- **Síndrome de Klinefelter:** ocurre cuando un varón posee una copia adicional del cromosoma X. Por lo tanto, su dotación génica es de 47 cromosomas, cariotipo 47, XXY. Incidencia 1/500 a 1/1000 varones. En este síndrome, no es infrecuente observar cariotipos con incluso 48 cromosomas (48, XXXY) (5).
- **Síndrome de Turner:** aparece en mujeres, debido a la pérdida de un cromosoma X, ya sea de forma parcial o total. El cariotipo de mayor prevalencia es 45, X. La

prevalencia poblacional oscila de 1/2000 a 1/5000 nacidos vivos de sexo femenino. La mayoría acaban en aborto espontáneo, sobre todo en el 1<sup>er</sup> trimestre de gestación (6).

- Síndrome triple X o trisomía X: aparece en mujeres que poseen 3 copias del cromosoma X (cariotipo 47, XXX). La incidencia se sitúa en 1 de cada 1000 mujeres nacidas vivas (7).
- Síndrome de Jacobs: varones que poseen un cromosoma Y extra. La incidencia se sitúa en 1 de cada 1000 nacimientos varones (cariotipo 47, XYY) (8).



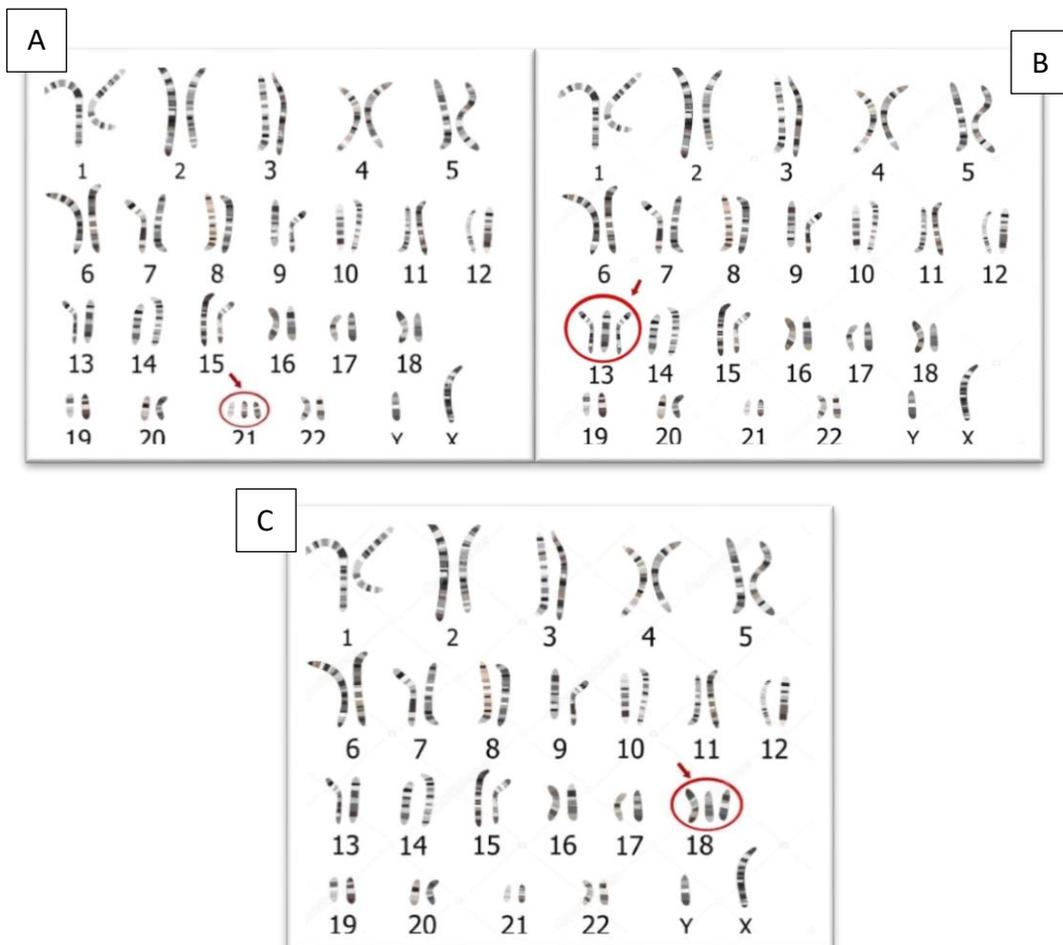
**Figura 1.** (A) Ejemplo de cariotipo de un Síndrome de Klinefelter, dotación cromosómica 47, XXY. (B) Ejemplo de un cariotipo de un Síndrome de Turner con dotación cromosómica 45, X (9, 10).



**Figura 2.** (A) Ejemplo de un cariotipo del Síndrome de Jacobs, dotación cromosómica 47, XYY. (B) Ejemplo de un cariotipo del Síndrome de triple X, dotación cromosómica 47, XXX (11, 12).

Las monosomías en autosomas no son compatibles con la vida. Únicamente lo son aquellas trisomías que afectan a cromosomas de bajo contenido en genes (cromosomas 13, 18 y 21):

- Trisomía del cromosoma 21 o Síndrome de Down: aparece cuando existe una copia adicional del cromosoma 21, ya sea total o parcial. Es la causa más frecuente de retraso mental identificable, con una incidencia que se sitúa en 1 de cada 800 nacidos vivos. (cariotipo 47, XX o XY, +21).
- Trisomía del cromosoma 13 o Síndrome de Patau: presencia de tres copias del cromosoma 13. La incidencia se sitúa en torno a 1 de cada 12.000 nacidos vivos, con una alta tasa de abortos espontáneos (cariotipo 47, XX o XY, +13) (13).
- Trisomía del 18 o Síndrome de Edwards: existencia de tres copias del cromosoma 18. Su incidencia oscila de 1/6000 a 1/13000 nacidos vivos. El 95-96% presentan una trisomía completa causada por una no disyunción (cariotipo 47, XX o XY, +18).



**Figura 3.** (A) cariotipo de un Síndrome de Down, dotación cromosómica 47, XY, +21. (B) Cariotipo de un Síndrome de Patau o trisomía del cromosoma 13, con una dotación cromosómica 47, XY, +13. (C) Cariotipo de un Síndrome de Edwards o Trisomía del cromosoma 18, con una dotación cromosómica 47, XY, +18 (14, 15, 16).

## ANOMALÍAS ESTRUCTURALES

Se producen como consecuencia de roturas cromosómicas seguidas de su posterior reconstitución en una combinación anómala. Se pueden producir muchos tipos de **reordenamientos estructurales** que afectan aproximadamente a uno de cada 375 nacidos vivos y pueden producirse de modo espontáneo o ser inducidas por agentes externos, tales como la radiación ionizante, algunas infecciones víricas y productos químicos. Pueden estar presentes en toda la dotación genética o en forma de mosaico.

Los reordenamientos estructurales se denominan equilibrados si se mantiene el complemento cromosómico normal, y desequilibrados si existe pérdida o ganancia de material genético. Algunas reordenaciones son estables, capaces de pasar por las divisiones mitóticas y meióticas sin alterarse; otras, sin embargo, son inestables. Para ser estable, un cromosoma reordenado debe contener elementos estructurales normales, incluidos un centrómero funcional y dos telómeros (17).

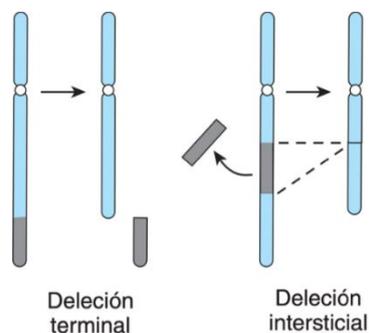
### REORDENAMIENTOS DESEQUILIBRADOS

El fenotipo suele ser anormal debido a la existencia de deleciones, duplicaciones e incluso la coexistencia de ambas. La duplicación de parte de un cromosoma origina una trisomía parcial, mientras que una deleción produce una monosomía parcial. Cualquier cambio que distorsione el equilibrio normal de genes funcionales puede ocasionar un desarrollo anormal.

Las **deleciones** suponen la pérdida de un segmento de un cromosoma lo que origina un desequilibrio por pérdida de información genética y puede producirse en el extremo de un cromosoma (deleción terminal) o a lo largo de uno de sus brazos (deleción intersticial) (Figura 4).

Las deleciones pueden originarse por:

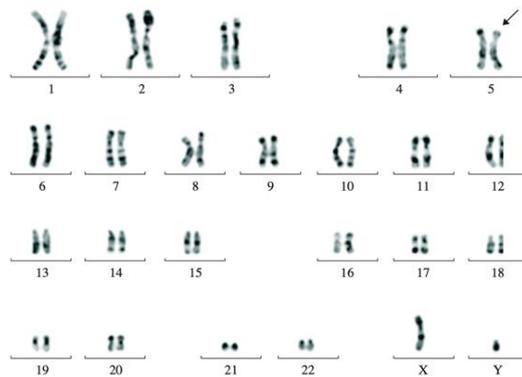
- Una simple rotura cromosómica y pérdida del segmento acéntrico.
- Entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos o cromátidas hermanas mal alineadas.
- Segregación anormal de una translocación o una inversión equilibradas.



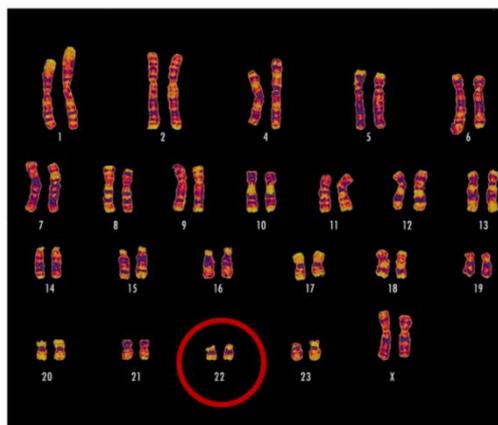
**Figura 4.** Reordenamiento estructural, deleciones terminales e intersticiales que generan fragmentos acéntricos (17).

Las consecuencias clínicas suelen reflejar haploinsuficiencia, la incapacidad de la copia única del material genético para llevar a cabo las funciones que normalmente efectúan las dos copias y, parecen depender del tamaño del segmento deleciónado, así como del número y las funciones de los genes que contiene. En el estudio de pacientes dismórficos y en el contexto del diagnóstico prenatal se han detectado numerosas deleciones, y el conocimiento de los genes funcionales perdidos en los segmentos deleciónados y su relación con las consecuencias fenotípicas se ha incrementado en gran medida a través del Proyecto Genoma Humano. Destacan Síndromes tales como el Síndrome del Maullido de Gato (deleción del brazo corto del cromosoma 5) el Síndrome de Prader Willi o el Síndrome de DiGeorge/Síndrome velocardiofacial (deleción a nivel del cromosoma 22 en concreto localizado en la banda 22q11).

Técnicas de bandeado de alta resolución, como la técnica FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)(sección 4.2.2 de este trabajo), pueden detectar deleciones que son demasiado pequeñas para ser detectadas en extensiones metafásicas. Para ser detectada por bandeado de alta resolución, una deleción debe afectar al menos a varios millones de pares de bases, mientras que la técnica FISH y las técnicas de micromatrices pueden detectar deleciones cariotípicamente indetectables o deleciones dudosas con consecuencias fenotípicas, utilizando para ello sondas específicas de la región de interés.



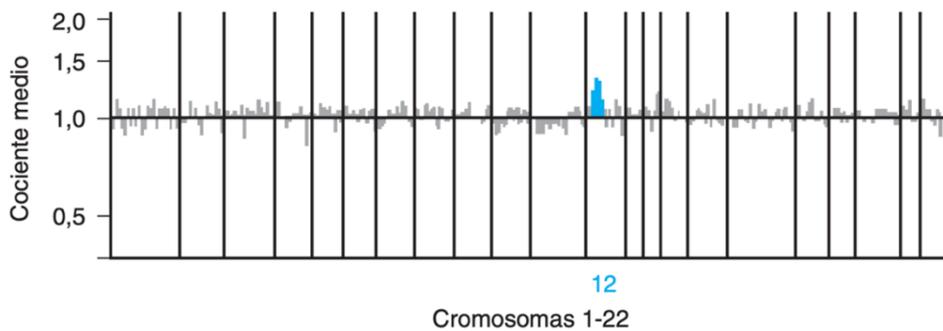
**Figura 5.** Cariotipo paciente 46, XY, del (5) (p15.3); “Síndrome del maullido de gato”. La deleción afecta a un fragmento cromosómico de gran tamaño, permitiendo su observación en un cariotipo convencional por tinción con Giemsa (18).



**Figura 6.** Cariotipo del Síndrome de DiGeorge consistente en una deleción localizada en la banda 22q11 en el cromosoma 22. En este caso se ha utilizado un marcaje FISH con sondas fluorescentes (19).

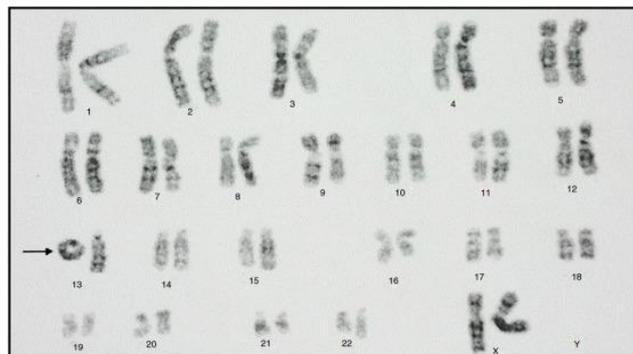
Las **duplicaciones** pueden ser debidas a un entrecruzamiento desigual o a una segregación anormal en la meiosis en un portador de una translocación o una inversión.

Una duplicación en un gameto produce un desequilibrio cromosómico (una trisomía parcial) y, se acompañan a menudo de algunas anomalías fenotípicas. Aunque se han descrito muchas duplicaciones, hasta el momento han sido pocas las que se han estudiado en profundidad. No obstante, ciertos fenotipos parecen asociarse con duplicaciones de determinadas regiones cromosómicas. Por ejemplo, la duplicación de todo o parte del cromosoma 12p da lugar al síndrome de Pallister-Killian, en el que los pacientes muestran características craneofaciales típicas, retraso mental y una amplia gama de otras malformaciones congénitas, posiblemente relacionadas con la trisomía o tetrasomía de genes específicos localizados en la región duplicada (figura 7).



**Figura 7.** Análisis de alteraciones cromosómicas mediante CGH sobre matrices (ver sección 4.2.4). En la figura se muestra la detección de una duplicación parcial en el brazo corto del cromosoma 12 (12p) en un paciente con cariotipo aparentemente normal y con sintomatología compatible con el Síndrome de Pallister-Killian (no se encuentran representados los cromosomas sexuales) (17).

En ocasiones, en las preparaciones cromosómicas pueden estar presentes unos cromosomas muy pequeños no identificados denominados **cromosomas marcadores**, que suelen aparecer en forma de mosaico. Constituyen un elemento extra en un complemento cromosómico normal, por lo que se denominan cromosomas supernumerarios o cromosomas extra estructuralmente anómalos. Son difícilmente identificables.

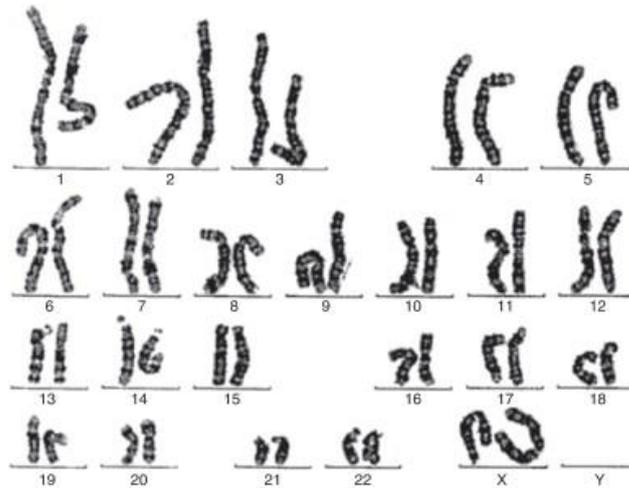


**Figura 8.** Cariotipo donde se puede observar la presencia de un cromosoma en anillo, en concreto el cromosoma 13. (20).

## Isocromosomas

Un isocromosoma es un cromosoma en el que se ha producido la pérdida de un brazo y el otro se ha duplicado de forma especular. Por tanto, una persona con 46 cromosomas portadora de un isocromosoma tiene una sola copia del material genético de un brazo (monosomía parcial) y tres copias del material genético del otro brazo (trisomía parcial).

El isocromosoma más común es el del brazo largo del cromosoma X, i(Xq) presente en algunas mujeres con Síndrome de Turner.



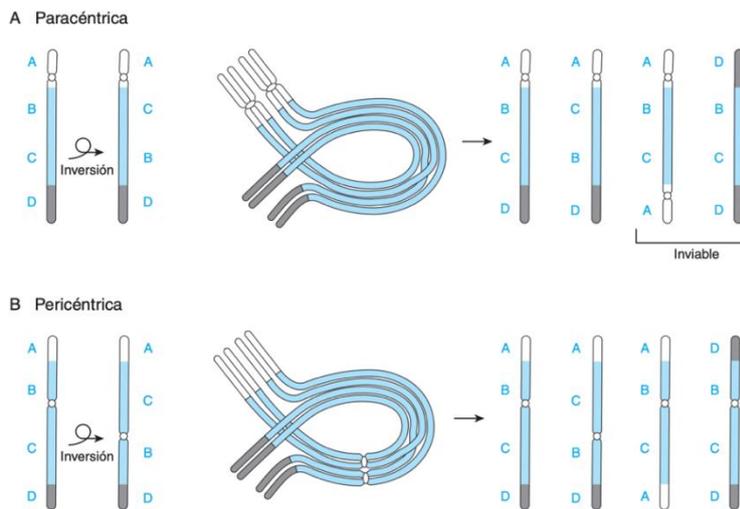
*Figura 9. Formación de un isocromosoma afectando al cromosoma X (21).*

## REORDENAMIENTOS EQUILIBRADOS

No tienen efectos fenotípicos ya que todo el material genético está presente.

Existen reordenamientos verdaderamente equilibrados y reordenamientos que, aunque parezcan equilibrados citogenéticamente, en realidad están desequilibrados a nivel molecular. Incluso cuando están verdaderamente equilibrados, los reordenamientos estructurales pueden suponer un riesgo para la siguiente generación, debido a que los portadores pueden producir una elevada proporción de gametos desequilibrados y presentar un mayor riesgo de tener descendencia anormal con cariotipos desequilibrados.

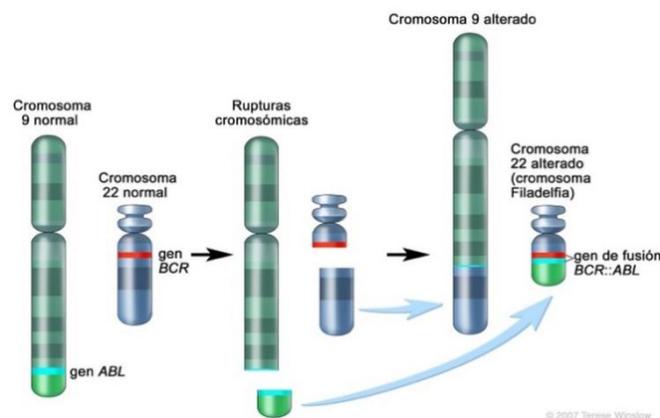
Las **inversiones** aparecen cuando un cromosoma sufre dos roturas y vuelve a reconstituirse con el segmento en posición invertida. Las inversiones son de dos tipos: paracéntricas (no incluyen el centrómero), en las que las dos roturas se producen en el mismo brazo, y pericéntricas (incluyen el centrómero), en las que existe una rotura en cada brazo. El principal problema de las inversiones es la producción de gametos desequilibrados, tal y como se observa en la siguiente figura:



**Figura 10.** Representación de entrecruzamiento entre bucles de inversión en meiosis I en portadores de un cromosoma con el segmento B-C invertido. (A) inversión paracéntrica. Los gametos formados tras la 2ª división meiótica tienen una copia normal (A-B-C-D) o equilibrada (A-C-B-D) del cromosoma, ya que los productos acéntricos y dicéntricos del entrecruzamiento son inviables. (B) inversión pericéntrica. Los gametos resultantes de la 2ª división meiótica son normales, equilibrados o desequilibrados. Estos últimos contienen una copia del cromosoma con una duplicación o una delección del material que flanquea el segmento afecto por la inversión (17).

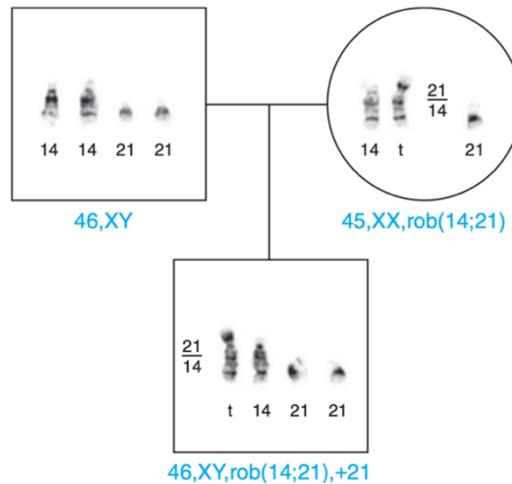
Las **translocaciones** consisten en un intercambio de segmentos entre dos cromosomas, generalmente no homólogos. Existen dos tipos principales, las recíprocas y las robertsonianas (17).

Las translocaciones **recíprocas** se producen como consecuencia de la rotura de cromosomas no homólogos con intercambio recíproco de los segmentos desprendidos. En general, sólo hay dos cromosomas implicados, y como el intercambio es recíproco, el número de cromosomas no varía, tal y como muestra la siguiente figura:



**Figura 11.** Translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. Se conoce como “Cromosoma Filadelfia” a la existencia de una translocación recíproca entre estos dos cromosomas. Tras la rotura cromosómica se produce una fusión de los genes BCR y ABL (este último perteneciente al cromosoma 9) en el cromosoma 22 (22).

En las **translocaciones robertsonianas** están implicados dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 ó 22) que se fusionan cerca de sus regiones centroméricas y pierden los brazos cortos. El cariotipo obtenido tiene 45 cromosomas y está equilibrado con el cromosoma translocado, compuesto por los brazos largos de dos cromosomas. Un ejemplo de translocación robertsoniana es aquella que produce la unión del brazo largo de los cromosomas 14 y 21.



**Figura 12.** Translocación robertsoniana 14q21 transmitida por una mujer portadora a su hijo afecto de Síndrome de Down. La dotación cromosómica del padre es normal. Se encuentran representados los cromosomas 14 y 21 y rob (14;21). La letra t significa translocación (17).

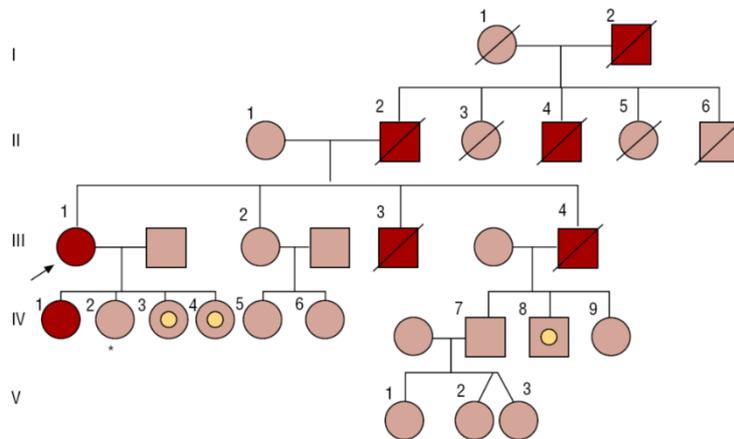
### 1.1.2. Enfermedades monogénicas

Su causa es la alteración en la secuencia de ADN de un único gen, es decir, están determinadas por alelos localizados en un único locus. Las variantes alternativas de un gen es lo que se denomina alelos. Si un individuo posee dos alelos idénticos en un locus codificado en el ADN nuclear se considera homocigoto; en el caso de que estos alelos sean diferentes se clasifica como heterocigoto o portador. Estas enfermedades consideradas monogénicas se caracterizan por presentar un patrón de transmisión entre familias. Los patrones que muestran este tipo de trastornos dependen principalmente de dos factores: que el fenotipo asociado a estas mutaciones sea de carácter dominante (para su expresión solo es preciso que uno de un par de cromosomas sea portador del alelo mutante) o fenotipo recesivo (en este caso es preciso que ambos cromosomas sean portadores de un par de alelos mutantes en un mismo locus) (17).

Estas mutaciones puntuales pueden afectar a autosomas o a cromosomas sexuales. De esta forma, considerando ambas variables, las enfermedades monogénicas pueden presentar distintos patrones de herencia. La detección del modo de herencia de una determinada enfermedad genética es fundamental para determinar a qué miembros de dicha familia es necesario realizar pruebas genéticas para determinar sus riesgos o saber si son portadores. De esta forma, en el asesoramiento genético podemos predecir la probabilidad de que exista descendencia afectada y detectar en qué casos debemos realizar los análisis genéticos en la etapa prenatal. Es importante conocer la información de la historia familiar, obteniendo árboles genealógicos, donde el individuo catalogado como probando es aquel en el que de forma inicial se ha detectado el trastorno genético. (17).

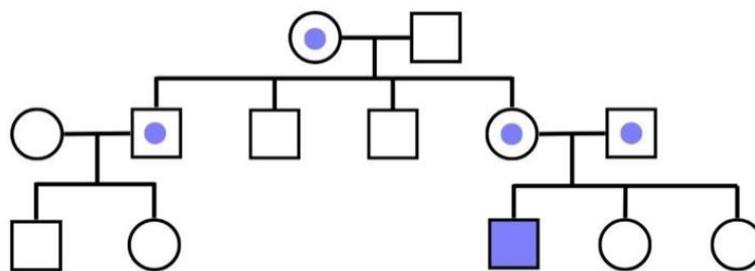
Los patrones de herencia son:

- Herencia autosómica dominante: fenotipo expresado tanto por individuos homocigotos como por heterocigotos. El fenotipo aparece en todas las generaciones. Uno de los progenitores del individuo afecto también lo estará. Cada hijo de un progenitor afecto presenta un riesgo del 50% de heredar el rasgo.



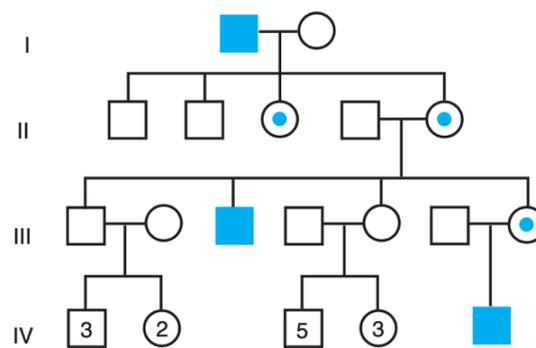
**Figura 13.** Árbol genealógico con herencia autosómica dominante. En este caso la enfermedad representada es la Miocardiopatía hipertrófica. El círculo hace referencia a una mujer, el cuadrado a un varón; en el caso de que estén coloreados de rojo quiere decir que están afectados por la enfermedad, si están tachados quiere decir que han fallecido. En cuanto al punto amarillo, son miembros donde se ha identificado la mutación, pero en la actualidad no están afectados. (23).

- Herencia autosómica recesiva: aquella en el que el fenotipo es expresado por los individuos homocigotos y no por los heterocigotos. La mayor parte de los trastornos con este tipo de herencia se deben a mutaciones con pérdida de función (eliminan o reducen la función del producto del gen).



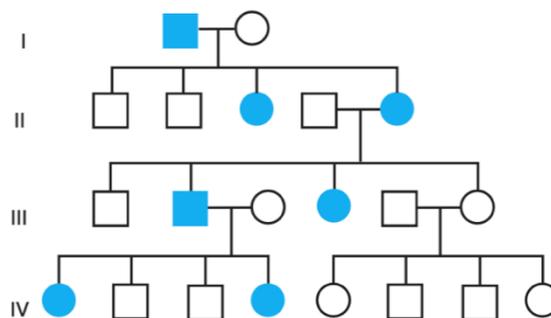
**Figura 14.** Representación de un árbol genealógico de una familia con trastorno autosómico recesivo, en este caso la enfermedad representada es la Fibrosis Quística. El símbolo del cuadrado hace referencia a un varón, el círculo a una mujer, la figura coloreada azul hace referencia a un individuo afecto de la enfermedad y en el caso de un punto azul en el centro de la figura hace referencia a un individuo portador de la enfermedad. En el caso del individuo afectado, ambos progenitores le han transmitido el gen alterado (CFTR) (24).

- Herencia dominante o recesiva ligada al cromosoma X: en este caso la dominancia o la recesividad de los trastornos ligados al cromosoma X no son absolutas, algunos fenotipos son expresados de forma constante por las portadoras (dominantes) y otros no (recesivos). En el caso de los trastornos con herencia recesiva ligada al X, el fenotipo característico causado por una mutación determinada aparecerá en todos los individuos de sexo masculino afectados y solo en las mujeres que sean homocigotas para la mutación. No obstante, algunas mujeres heterocigotas expresan la enfermedad con intensidad variable, debido a una inactivación aleatoria del cromosoma X. La hemofilia A es un ejemplo de este tipo de herencia. En este caso es muy importante, por ejemplo, poder determinar a través de una prueba genética el sexo del feto en un análisis prenatal. Un hombre afecto de un trastorno con este tipo de herencia (recesiva ligada al cromosoma X) transmite el gen responsable a todas sus hijas. Se ha descrito la existencia de mutaciones de novo.



**Figura 15.** Árbol genealógico con herencia recesiva ligada al X, en este caso la enfermedad representada es la Hemofilia A. Se transmite de un individuo de sexo masculino a través de individuos de sexo femenino resultando enfermos individuos de sexo masculino de sucesivas generaciones (17).

- En cuanto a la herencia ligada al X dominante, el fenotipo se expresa en heterocigotos. En este caso, los hijos de hombres afectados con pareja normal no tienen hijos varones afectados. Esto permite diferenciarlo de la herencia autosómica dominante. Por lo tanto, al observar un árbol genealógico de una familia afectada por un trastorno con herencia ligada al X dominante veremos que ninguno de los hijos varones está afecto y sin embargo todas las hijas lo estarán. Es frecuente que las mujeres afectas sean heterocigotas y por lo tanto la expresión de la enfermedad sea más leve, debido a que el alelo mutante se localiza en el cromosoma X, inactivo en algunas de sus células.



**Figura 16.** Árbol genealógico con herencia ligada al cromosoma X dominante, en este caso existe presencia de la enfermedad en todas las generaciones. (17).

- Herencia ligada al cromosoma Y: el gen alterado causante se encuentra en el cromosoma Y. Únicamente puede transmitirse de padres a hijos varones. Existen deleciones intersticiales que afectan al brazo largo del cromosoma Y, las cuales se han asociado a azoospermia no obstructiva en un 10% de los casos y a oligospermia grave en un 6% de los casos aproximadamente. Esto determina que uno o más genes denominados AZF (factor/es de azoospermia) que se encuentran en el cromosoma Y están implicados en el proceso de espermatogénesis (AZFa, AZFb y AZFc). En función de la zona AZF del cromosoma Y donde se encuentren las mutaciones la repercusión de estas será distinta. Si la región afectada es AZFa, se ha relacionado con el Síndrome de Sertoli, por lo tanto, varones que presenten este tipo de alteraciones pueden presentar azoospermia y disminución del tamaño testicular. En el caso que la zona afectada sea AZFb o AZFb/c se ha relacionado con la detención en el proceso de formación de los espermatozoides y por lo tanto la ausencia de estos en su forma final. Si la zona afectada se corresponde con AZFc, el varón puede presentar azoospermia u oligospermia (25). Otro gen implicado en espermatogénesis en el cromosoma Y es el gen USP9Y. Su función todavía no se conoce con exactitud, pero se sabe que es necesario para la espermatogénesis normal (17).

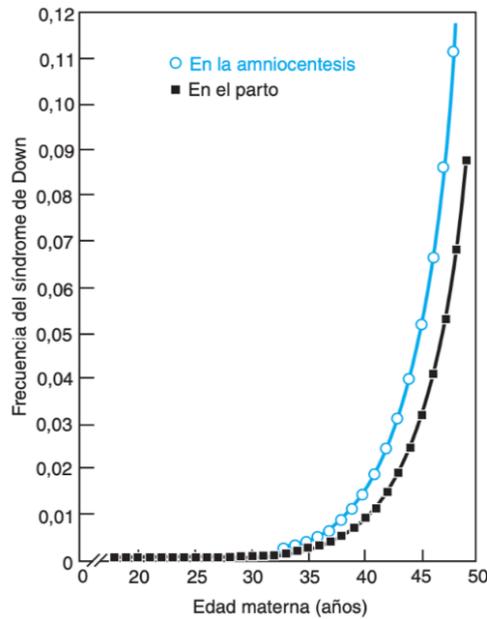
### **1.1.3. Enfermedades de carácter multifactorial**

Las enfermedades de carácter multifactorial son aquellas que hacen referencia a una etiología múltiple, es decir, causada por muchos factores. En estos trastornos, la agregación familiar se explica debido a que los miembros de una familia poseen información genética común, además de que la exposición de una misma familia a determinados factores ambientales es similar si se compara a la de una población seleccionada aleatoriamente. Esto nos lleva a la conclusión de que aquellos familiares de un individuo afecto por una determinada enfermedad poseen una mayor probabilidad de sufrir las mismas interacciones gen-gen y gen-ambiente responsables de esta. Por lo tanto, cuando se habla de herencia multifactorial se refiere a la interacción entre el genotipo y uno o múltiples loci, lo que llevará a un aumento o disminución de la susceptibilidad de padecer una enfermedad, sumado a las diversas exposiciones ambientales.

Normalmente este tipo de enfermedades de carácter multifactorial aparece en la edad adulta, precisamente por ser una combinación no sólo de factores genéticos, sino también de factores ambientales y del estilo de vida. Aquellos que aparecen en la etapa prenatal (por ejemplo, defectos del tubo neural, etc) no pueden detectarse en un análisis genético, dada su complejidad. Por este motivo, no procede un análisis más exhaustivo de los mismos en este trabajo.

## **1.2 INFLUENCIA DE LA EDAD MATERNA Y PATERNA EN EL RIESGO DE DESARROLLO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS**

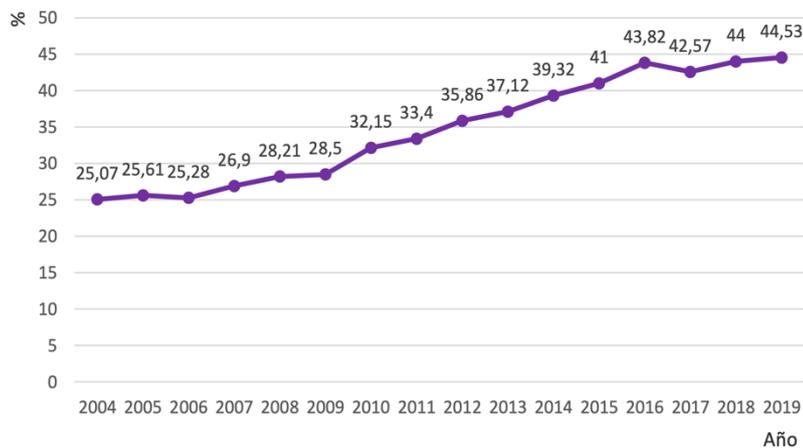
Existen diversos factores que pueden implicar la aparición de estas anomalías. La edad materna avanzada, por ejemplo, está directamente implicada en la aparición de aneuploidías.



**Figura 17.** Relación entre la edad materna y trisomía del cromosoma 21, en el parto y en la amniocentesis. A medida que aumenta la edad materna, aumenta la incidencia de Síndrome de Down, disparándose a partir de los 35 años. A los 40 años, la incidencia es de 0,015 (1 de cada 66 embarazos) (17).

El problema se debe a la detención del proceso de ovogénesis desde la etapa fetal hasta el momento de la maduración del ovocito. Los ovocitos primarios detienen su primera división meiótica en la etapa de diploteno durante el desarrollo fetal, reanudándose posteriormente en cada ovulación. Esto conlleva un aumento de la incidencia de los errores en la segregación cromosómica, lo que a su vez implica un incremento del riesgo de aparición de anomalías cromosómicas numéricas (26).

Según el INE, en España, la edad a la que las mujeres tienen su primer hijo está en aumento, por lo tanto, el riesgo de anomalías cromosómicas es muy alto. De ahí la importancia de los programas de cribado en la población (27).



Fuente: INE Movimiento Natural de la Población 2019

**Figura 18.** Porcentaje de gestantes con edad mayor o igual a 35 años en el momento del parto en Cantabria (periodo 2000-2019). En el año 2019 el 44,53% de las gestantes en el momento del parto tenía una edad igual o superior a 35 años (28).

La edad paterna también tiene impacto, en concreto en la aparición de mutaciones puntuales. En este caso no hay una edad determinada que haya sido aceptada como avanzada (29).

En el caso de los varones no existe la detención de la espermatogénesis desde la etapa fetal hasta la etapa adulta como ocurre en las mujeres. No obstante, el incremento de la edad paterna se ha asociado con microdeleciones en el cromosoma Y, además de un incremento de mutaciones puntuales (17). La causa radica en que, en el proceso de espermatogénesis, cada célula madre que entra en meiosis ha sufrido previamente un ciclo de replicación. A medida que aumenta la edad del hombre, más replicaciones han sufrido sus espermatocitos primarios cuando entran en meiosis. Las mutaciones van asociadas a errores en el proceso de replicación del ADN (el propio proceso de replicación introduce errores cada cierto número de bases). Por este motivo, el tipo de enfermedades genéticas asociadas a una edad paterna avanzada son enfermedades monogénicas debidas a mutaciones puntuales en un determinado gen.

## 2. OBJETIVOS

Los avances en el conocimiento de nuestro genoma nos han permitido avanzar en el conocimiento de alteraciones y enfermedades genéticas asociadas a diferentes tipos de mutaciones. La tecnología, en paralelo, ha avanzado en el desarrollo de novedosas técnicas para su análisis.

El objetivo de este trabajo es el análisis de las diferentes técnicas disponibles en la actualidad para la detección prenatal de anomalías genéticas. Se tratará su importancia en el diagnóstico prenatal, y se analizarán las ventajas, inconvenientes y limitaciones de cada una de ellas.

## 3. METODOLOGÍA

Desarrollo de técnicas aplicadas a la detección de enfermedades genéticas en la etapa prenatal.

Se ha llevado a cabo una revisión narrativa para la cual se realiza una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos (Pubmed, Scielo...) utilizando diferentes palabras clave, además de dos tesauros con lenguaje controlado combinándolo con operadores booleanos: OR, AND.

- DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud): Diagnóstico prenatal, Diagnóstico prenatal no invasivo, Mapeo óptico del Genoma, Secuenciación masiva, Genoma humano.
- MeSH (Medical Subject Headlines): prenatal diagnosis, Non-invasive prenatal diagnosis, massive sequencing, Optical genome mapping.

Además, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de artículos científicos en Google académico, así como en editoriales científicas como Elsevier, utilizando lenguaje como: "Diagnóstico prenatal no invasivo", "NGS", "Influencia de la edad materna en el desarrollo de anomalías genéticas", "Mapeo óptico del genoma", etc. Por último, se hizo una búsqueda en libros tales como el Thompson de genética.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ANÁLISIS DE LAS TÉCNICAS DISPONIBLES EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL**

El diagnóstico prenatal de cromosomopatías comenzó a finales de la década de los 50, gracias a la posibilidad de cultivar células presentes en el líquido amniótico y de determinar el cariotipo a partir de estas.

La indicación de un estudio genético prenatal en España, de acuerdo con la normativa vigente (Orden SSI/2065/2014 (BOE del 6 de noviembre)), se da en los siguientes casos:

- Sospecha de presencia de un elevado riesgo de padecer una enfermedad genética grave fetal y/o progenitores con historia familiar de patología genética severa.
- La enfermedad de sospecha se relaciona con una alteración genética conocida y que puede ser identificada mediante análisis genético.
- De los resultados y conclusiones obtenidos con el estudio genético prenatal se puedan tomar decisiones que permitan manejar de una manera óptima la gestación, el recién nacido o incluso la toma de decisiones reproductivas (30).

En este trabajo, se ha realizado un primer análisis de los tipos de técnicas disponibles para diagnóstico prenatal diferenciando entre aquellas consideradas invasivas y las que forman parte del diagnóstico prenatal no invasivo.

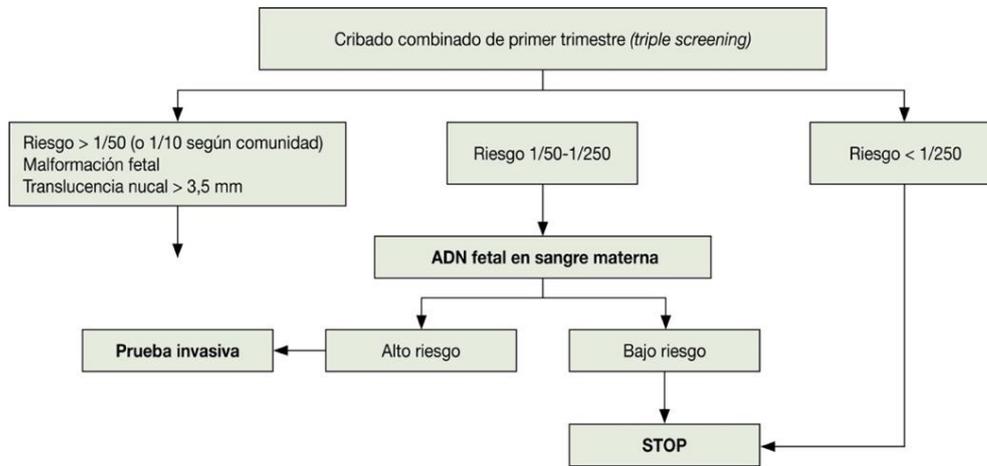
##### **4.1. TÉCNICAS DE ANALISIS NO INVASIVAS**

Se consideran técnicas no invasivas las que no presentan ningún riesgo para el feto, al no acceder a su medio interno. Además, se consideran pruebas de cribado, ya que con las tecnologías actuales su resultado estima el riesgo de aparición de anomalías, pero en ningún caso pueden ser utilizadas como pruebas diagnósticas. El resultado no es definitivo y debe de ser confirmado.

###### **4.1.1. Cribado combinado del 1<sup>er</sup> trimestre**

La prueba de cribado poblacional deja a un lado las técnicas invasivas, marcándose como objetivo la identificación de gestantes con riesgo de tener fetos con anomalías genéticas utilizando marcadores ecográficos y marcadores bioquímicos, además de incluir la edad materna y edad gestacional como factores de riesgo. Debe ofrecerse a todas las embarazadas independientemente de su edad. Permitirá la detección de fetos clasificados como de alto riesgo de padecer una anomalía genética (31, 32).

A las mujeres gestantes cuyo resultado sea clasificado como de alto riesgo, se les debe ofrecer la realización de la prueba de análisis de ADN fetal en sangre materna. Esta prueba no es diagnóstica y, por lo tanto, ante un resultado catalogado como alto riesgo se les ofrecerá una prueba invasiva (Figura 19).



**Figura 19.** Algoritmo de cribado combinado del primer trimestre de gestación que muestra el protocolo a seguir en función del riesgo estimado del feto afecto por una anomalía genética. Si el resultado de la prueba es un riesgo  $<1/250$  no se realiza ninguna prueba complementaria más. En el caso de un riesgo situado entre  $1/50-1/250$  se realizará una prueba de ADN fetal en sangre materna. Cuando el riesgo sea elevado  $>1/50$  se realizará una prueba invasiva. En este caso el algoritmo corresponde al hospital del Mar en Barcelona, motivo por el cual el punto de corte cambia un poco respecto al de Cantabria (33).

La tasa de detección de anomalías cromosómicas a partir de este cribado combinado del primer trimestre es un 90-93% para la trisomía del cromosoma 21, y un 95% para las trisomías de los cromosomas 13 y 18. En las tres cromosopatías la tasa de falsos positivos es del 5% (33).

Respecto al protocolo de atención al embarazo y puerperio en Cantabria, el Test combinado del primer trimestre se ofrece a las gestantes que acudan a control de embarazo con menos de 14 semanas de gestación (preferiblemente en las semanas 10-11), con el objetivo de individualizar el riesgo de feto afecto por aneuploidías, utilizando marcadores bioquímicos y ecográficos y siguiendo el Programa de Detección Prenatal de Anomalías cromosómicas vigente en Cantabria (34).

Los marcadores bioquímicos analizados son:

- Niveles de fracción libre de gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ HCG Libre). Sus niveles se encuentran elevados por ejemplo en la trisomía del cromosoma 21.
- Niveles de proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), disminuidos en la trisomía del cromosoma 21.

Además, se realizará una ecografía de primer trimestre entre las semanas 11-13+6, en la cual se medirán diversos marcadores ecográficos: la translucencia nucal (TN) y la longitud craneocaudal del feto. La TN es de gran utilidad cuando su valor está aumentado, actuando como marcador de diversas anomalías genéticas, siendo la más

importante la trisomía 21, además de las trisomías 18 y 13, monosomía del cromosoma X o alteraciones estructurales, en especial cardíacas.

La mayor tasa de detección se sitúa en la semana 11; no obstante, es en la semana 12 cuando el análisis de otros marcadores ecográficos, además de una buena exploración anatómica fetal se puede realizar (31). Existen otros parámetros ecográficos de segunda línea, como el hueso nasal, el flujo tricuspídeo y el ductus venoso. Además, la medición de la frecuencia cardíaca del feto es útil en la determinación de una posible trisomía del 13, ya que está aumentada en el 80% de los casos.

Los datos obtenidos se introducen en el programa informático disponible para el cálculo del riesgo, junto con otros parámetros (edad, raza, peso...) estableciéndose un riesgo individualizado correspondiente a la gestación. En función de este riesgo establecido se procederá de la siguiente forma:

Si el resultado se encuentra por debajo del punto de corte establecido (1/270 en Cantabria), se informará a la gestante de que el riesgo es bajo, finalizando en este punto el cribado y continuando con un protocolo normal en el seguimiento del embarazo. Este punto de corte es muy similar en las diferentes Comunidades Autónomas (1/250 por ejemplo en Cataluña, tal y como muestra la figura 19).

En el caso de riesgo alto, cuando el resultado se encuentra por encima del punto de corte, se deberá informar a la gestante de dicho resultado, además de derivarle a la consulta de genética del HUMV para proporcionarle asesoramiento genético sobre las posibles opciones de confirmación diagnóstica. En Cantabria, y como primera opción, se ofrece a estas mujeres la posibilidad de realizar otra prueba de cribado (no invasiva) más específica: el análisis de ADN fetal en sangre materna.

#### 4.1.2. Análisis de ADN fetal en sangre materna

La posibilidad de detección de ADN de origen fetal libre en una muestra de sangre de la madre está disponible desde hace unos años (30). El origen del ADN fetal se atribuye a células hematopoyéticas apoptóticas, así como a la destrucción del trofoblasto. Este ADN atraviesa la placenta y puede ser detectado. La cantidad de ADN fetal presente en la sangre materna aumenta en el transcurso de la gestación, situándose la proporción de ADN fetal entre un 3 y un 20% del total de ADN libre circulante (30). No obstante, existen factores que pueden modificarlo, como la edad materna, su índice de masa corporal, aneuploidías, hábitos tóxicos o presencia de una enfermedad inmune activa, entre otros. A mayor proporción de ADN mayor será el rendimiento de la prueba (30).

#### Protocolo prueba de análisis de ADN fetal en sangre materna en Cantabria

En el caso del protocolo vigente en Cantabria para la indicación de la técnica de estudio de ADN fetal libre en sangre materna (34), se ofrecerá a la mujer gestante cuando cumpla alguno de los siguientes supuestos:

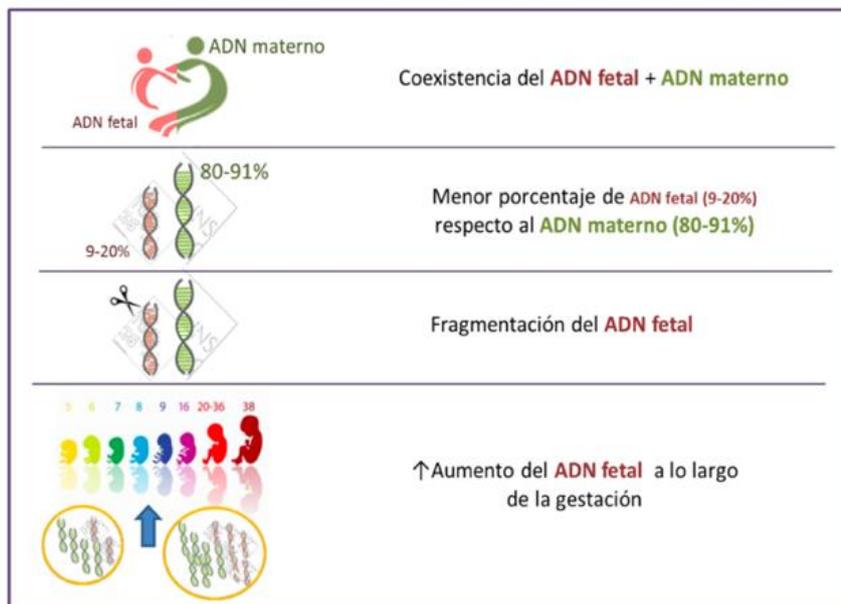
- Gestante con cribado combinado del primer trimestre de riesgo alto, siempre que sea una gestación única (en gestación gemelar se individualizará cada caso),

no exista malformación mayor ecográfica fetal y la translucencia nucal esté en el rango de valores normales.

- Gestante con embarazo previo con aneuploidías en los cromosomas 21, 18 o 13.
- Gestante y/o pareja portadora de anomalía cromosómica equilibrada. En este caso, se debe individualizar el asesoramiento según la anomalía.

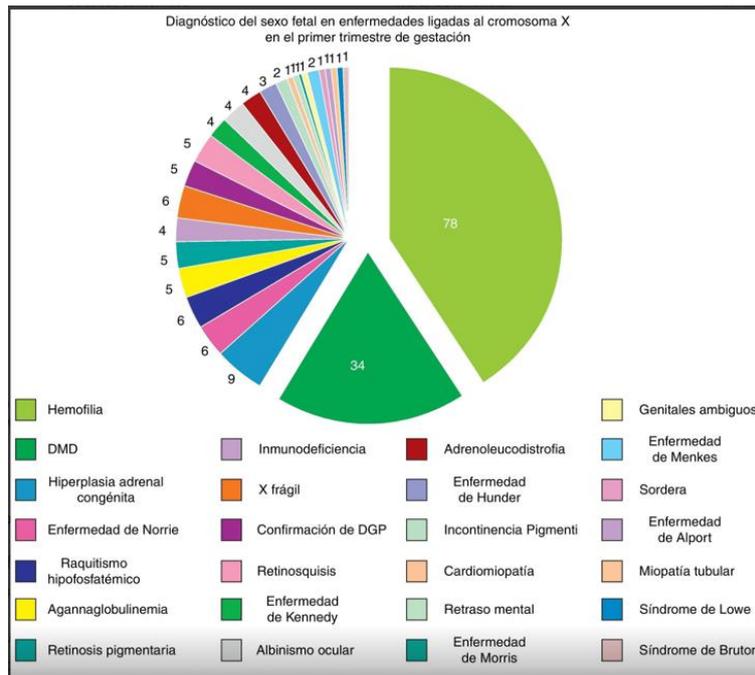
Es importante señalar que no deja de ser un método de cribado, pero con una tasa de detección superior y una tasa de falsos positivos inferior a la técnica de cribado combinado del primer trimestre. En la mayoría de los estudios publicados hasta el momento, realizados en población de alto riesgo de padecer trisomías del 21, 13 o 18, se ha establecido la indicación de esta prueba en lugar del procedimiento invasivo. En cualquier caso, ante un resultado positivo precisa de confirmación mediante un método invasivo.

El ADN circulante se puede detectar a partir de la 6ª semana de gestación. Tras el parto (aproximadamente 48 horas después) desaparece. De esta forma, no existe ADN fetal circulante proveniente de embarazos previos.



**Figura 20.** Coexistencia del ADN fetal con el ADN materno y proporciones. La fragmentación del ADN fetal se debe a la liberación del mismo por parte de células apoptóticas placentarias. El tamaño de los fragmentos de ADN fetal es menor que el de los fragmentos de ADN materno (35).

Inicialmente, la presencia de ADN fetal en sangre materna se determinó gracias a la detección de secuencias del cromosoma Y cuando el feto era un varón. De esta forma, utilizando este método constatado como técnica no invasiva, el primer diagnóstico disponible fue el sexo del feto; basado en la presencia o ausencia de ese cromosoma Y (en concreto secuencias pertenecientes a los genes SRY y DSY14). Por este motivo, las enfermedades con un patrón de herencia ligada al cromosoma X pueden justificar la indicación de la determinación del sexo fetal (Figura 21).



**Figura 21.** Representación esquemática del amplio espectro de enfermedades genéticas de diferente consideración según el sexo del feto (36).

#### Metodología, toma de muestra y aislamiento del ADN fetal:

La recogida de la muestra se lleva a cabo mediante la extracción periférica de una cantidad de sangre (~1,6-4,2 ml). Posteriormente, el procesado de la muestra se lleva a cabo mediante centrifugación a 4°C durante 10 min, con el fin de separar el plasma (sobrenadante) de la fracción celular (precipitado). La conservación del plasma se lleva a cabo en condiciones óptimas, a temperaturas entre -80°C y -30°C.

Una de las limitaciones de la técnica es la baja proporción de ADN fetal existente en la muestra. Para tener una mayor concentración, es necesario aumentar el porcentaje de ADN fetal y disminuir el ADN materno. Para ello se realiza un primer fraccionamiento que identifica moléculas de ADN de menos de 300pb de longitud, ya que se ha demostrado que las moléculas de ADN fetal presentes en sangre materna son más pequeñas que las correspondientes a ADN materno; tienen menos de 300pb de longitud. Este primer fraccionamiento específico permite, por lo tanto, enriquecer la muestra hasta alcanzar valores en torno a un 70 % de material genético fetal (37). La disminución del material genético de origen materno se consigue añadiendo formaldehído a la muestra de plasma, lo que estabilizará las células e inhibirá la liberación de ADN (37). Seguidamente el análisis se realiza por secuenciación del material genético aislado.

La técnica de NGS (*Next Generation Sequencing*) es lo que se conoce como secuenciación de nueva generación. Permite secuenciar, de forma paralela, millones de fragmentos de ADN, permitiendo detectar diversas alteraciones genómicas tales como inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, variantes de un solo nucleótido... así como algunas alteraciones estructurales equilibradas. Además, esta técnica permite el estudio tanto

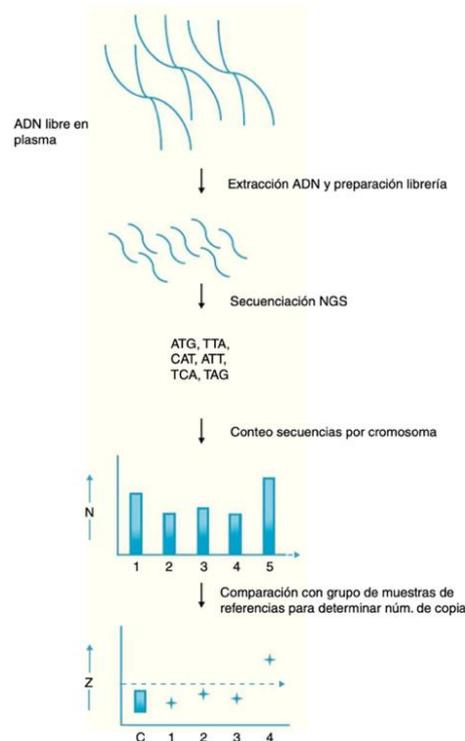
del genoma completo, como del exoma completo (parte codificante del genoma) y de paneles personalizados (38).

En el ámbito del diagnóstico prenatal, permite detectar alteraciones numéricas de los cromosomas fetales, así como duplicaciones y deleciones (39, 40). El procedimiento consiste en:

1. Fragmentación del ADN fetal previamente enriquecido y unión de adaptadores para conformar una librería
2. Utilización de una superficie sólida para ligar el material amplificado.
3. Secuenciación del material genético, que se lleva a cabo de forma masiva y paralela (al mismo tiempo en todas las moléculas de ADN).
4. Comparación con un genoma de referencia y almacenamiento de información.

#### Aplicación de la técnica de NGS para la detección de aneuploidías:

La utilización del NGS en el diagnóstico prenatal no invasivo actualmente ha demostrado su eficacia en la detección de aneuploidías. Utilizando la muestra preparada siguiendo el protocolo anterior, se secuencian fragmentos enriquecidos para regiones concretas, se alinean con el genoma de referencia y se procede a su análisis informático, determinando la existencia de exceso o defecto de secuencias de ADN. Esto es aplicable tanto para aneuploidías donde es un cromosoma entero lo que se encuentra afectado, como para la detección de duplicaciones y deleciones (41) (Figura 22).



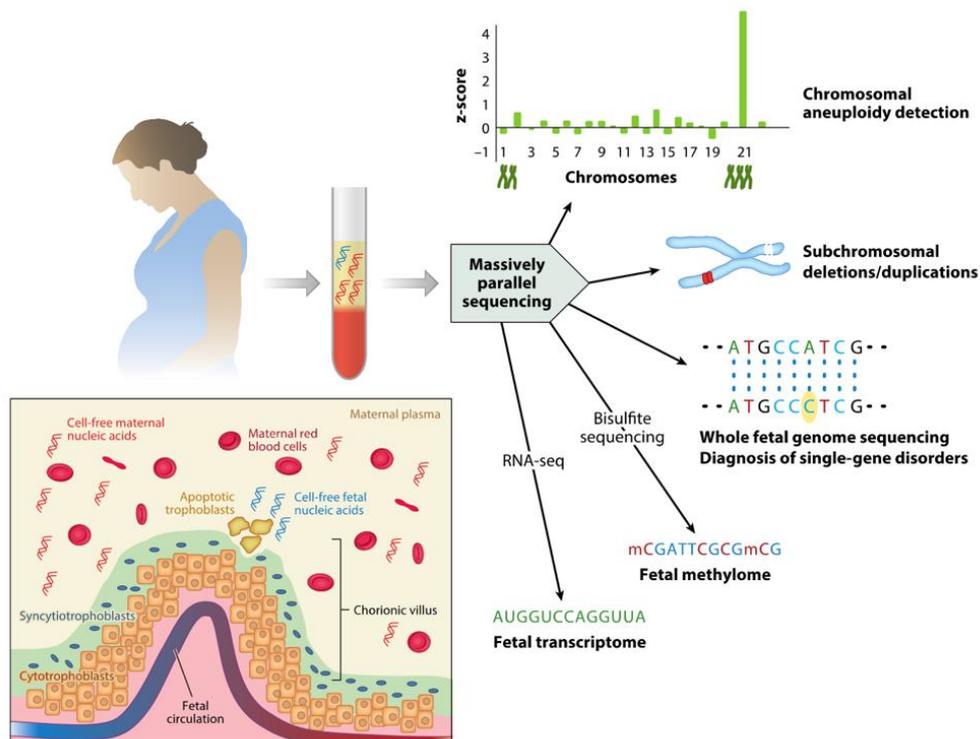
**Figura 22.** Detección de aneuploidías fetales mediante la técnica de NGS. En las dos gráficas inferiores se encuentran representadas el conteo de número de lecturas de cada cromosoma (gráfica superior), así como la comparación con muestras de referencias (gráfica inferior). La letra Z hace referencia a un punto de corte prefijado (Z score) que permitirá determinar la dotación cromosómica (41).

La interpretación de los resultados se realiza en función del número de lecturas obtenidas para un cromosoma concreto (o una región cromosómica) en relación con un genoma de referencia. Por ejemplo, en el caso de una trisomía del cromosoma 21, la cantidad de material genético esperado es mayor que la del genoma de referencia, por lo que el número de lecturas pertenecientes al cromosoma 21 será mayor que las que se obtienen de fetos normales (41).

Existen diferentes técnicas de NGS empleadas:

- MPSS (proviene del inglés, *genoma wide Massively Parallel Shotgun Sequencing*). Mediante esta técnica se secuencian la totalidad del genoma circulante. Posteriormente, mediante un análisis informático, se agrupa en base al genoma humano de referencia cada secuencia que ha sido amplificada. Es preciso discernir entre el ADN materno y el fetal, lo cual se realiza mediante el análisis de la dosis relativa de haplotipos (conjunto de alelos presentes en la región de un cromosoma que se heredan como un bloque).
- DANSR (proviene del inglés, *Digital Analysis of Selected Regions*). En este caso el objetivo de la secuenciación consiste en la amplificación de regiones determinadas de los cromosomas analizados. Se emplea un sistema de microarrays para identificar cambios de nucleótidos en el ADN materno y fetal, lo que permitirá una cuantificación del ADN fetal.

Es importante señalar que la tecnología MPSS, además de la detección de aneuploidías, permite además otras aplicaciones, como perfiles de metilación y expresión génica (Figura 23). Sin embargo, estas aplicaciones aún necesitan un mayor desarrollo para poder ser utilizadas en el diagnóstico prenatal.



**Figura 23.** Resumen de las aplicaciones del diagnóstico prenatal no invasivo basado en la técnica de MPSS. El ADN fetal circulante libre es de origen en su mayoría apoptótico, en concreto trofoblástico. Permite obtener resultados del genoma fetal a nivel cromosómico y subcromosómico, además de perfiles de metilación y de expresión génica, lo que se conoce con el nombre de transcriptoma (42).

Medidas de validez interna y medidas de validez externa de la prueba:

En cuanto a las medidas de validez interna, sensibilidad y especificidad; no dependen de la prevalencia de la enfermedad y varían en función de la anomalía cromosómica. En concreto, para la trisomía 21 se obtienen los mejores valores, con una sensibilidad mayor del 99%. Estos valores son algo inferiores para las trisomías 18 y 13 (Figura 24).

Las medidas de validez externa, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), sí dependen de la prevalencia de la enfermedad y se sitúan con valores elevados, algo mayores de nuevo para la trisomía del 21 que para el resto de las aneuploidías.

	Sensibilidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>Trisomía 21</b>	>99	71-87	99,9
<b>Trisomía 13</b>	97,7	83	99,9
<b>Trisomía 18</b>	96,1	63	99,9

VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

**Figura 24.** Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del ADN fetal libre circulante para las trisomías 21, 13 y 18 (33).

En cuanto a la posibilidad de fallo de la prueba, la tasa es superior a la de cribado combinado del primer trimestre (del 3 % al 1 %) y está ligada a la técnica de recogida del test o a la edad gestacional de la mujer. Otro aspecto a valorar son los resultados erróneos, catalogados como falsos positivos o falsos negativos. En el primer caso la tasa es algo inferior en la trisomía del 21 que en las trisomías 13 y 18, no superando en ningún caso el 0,2%.

Factores influyentes en la tasa de falsos positivos:

- Gemelo evanescente: ocurre ante una situación de embarazo de inicio gemelar, con posterior pérdida de uno de los fetos, probablemente aneuploide. Existe una reabsorción posterior ya sea parcial o total, pero con persistencia de emisión de ADN fetal tras la muerte por parte del tejido placentario, el cual es detectado.
- Mosaicismos maternos: en este caso la anomalía detectada pertenece a la madre, debido a la existencia de células con posible alteración de su cariotipo.
- Cáncer materno: presencia de ADN libre tumoral, aunque esta causa es excepcional.

- Gestantes trasplantadas o transfusiones sanguíneas recientes: en este caso sería el ADN del donante lo que puede ser detectado y provocar la alteración del resultado.

Factores influyentes en la tasa de falsos negativos:

- Fracción de ADN fetal circulante baja, que puede ocurrir cuando la prueba se realiza a una edad gestacional temprana.
- Fallos en la técnica.
- Mosaicismos confinados a la placenta, (presencia en el feto de una aneuploidia en ausencia de afectación de tejido placentario).
- Alteraciones cromosómicas de origen materno, errores en la interpretación, sobre todo en deleciones cromosómicas maternas y presencia de fetos aneuploides cuando se encuentran las anomalías en los mismos cromosomas (33).

#### Limitaciones de la técnica de Diagnóstico Prenatal no invasivo en cribado de aneuploidías

Una de las principales limitaciones radica en lo explicado antes, especialmente en tasas de falsos positivos. Este es el motivo principal por lo que la técnica se clasifica como prueba de cribado (43). Es preciso la presencia de una fracción de ADN fetal circulante que supere el 4%, parámetro que se puede ver afectado en diversas situaciones como la obesidad materna, ya que la fiabilidad disminuye en aquellas con un peso superior a 90kg (Figura 19).

Peso Materno (kg)	n	Embarazos con $\geq 4\%$ de cffDNA (%)
<50	809	99.8
50-59	4825	99.6
60-69	6224	99.2
70-79	4313	98.8
80-89	2574	98.2
90-99	1608	96.3
100-109	92	93.9
110-119	508	89.8
120-129	298	87.9
130-139	172	81.4
$\geq 140$	132	71.2

**Figura 25.** Proporción de embarazos con un % de ADN circulante fetal mayor o igual al 4% en función del peso de la mujer gestante. A medida que aumenta el peso materno disminuye el porcentaje de ADN fetal circulante. En el caso de madres con peso inferior a 50 kilogramos el porcentaje de ADN fetal se sitúa en torno al 99,8%. En el extremo opuesto, cuando el peso materno es igual o superior a 140 kilogramos, el porcentaje de ADN fetal circulante en sangre materna disminuye hasta el 71,2% (42).

Otras limitaciones de esta técnica son las siguientes:

- Imposibilidad para discernir entre los tipos específicos de aneuploidías. Poniendo como ejemplo la trisomía del cromosoma 21, no podrá determinar si es a causa de un mosaicismo, de una translocación robertsoniana o por la presencia de un cromosoma extranumerario.
- Imposibilidad para detectar ciertas alteraciones cromosómicas como las translocaciones equilibradas (inversiones y translocaciones, por ejemplo).
- Ocasionalmente se han obtenido resultados positivos siendo la madre la causante al ser portadora de una alteración cromosómica desconocida.

#### Asesoramiento pre y post test

Es muy importante informar a las gestantes del alcance del estudio, sus ventajas y limitaciones previamente a la realización de la prueba, además de los posibles resultados inciertos (40). De esta forma, en el documento de consentimiento informado que debe firmar la mujer gestante deben aparecer reflejados aspectos tales como:

- Información acerca de la técnica: como se lleva a cabo.
- Objetivos de la prueba.
- Tiempo de respuesta.
- Ventajas y limitaciones de la prueba.
- Derecho a recibir o no la información al completo.
- Un resultado normal no excluye la presencia de otra causa genética no detectable por esta técnica.
- Incapacidad de interpretación de algunos resultados con la tecnología actual.

#### Otras aplicaciones clínicas del análisis del ADN en sangre materna:

##### 1. Predicción del sexo fetal

La determinación del sexo fetal se realiza mediante la detección de genes determinados del cromosoma Y (criterio de presencia/ausencia). Generalmente de secuencias del gen SRY o del marcador DSY14 que se encuentra en el gen TSPY1. El primer caso es el de elección. No obstante, el marcador DSY14 presenta una mayor sensibilidad y eficiencia en el primer trimestre, ya que existen diversas copias de este repetidas en tándem. Por lo tanto, es posible realizar la detección del sexo fetal a partir de la semana 6 mediante el marcador DSY14 y en la semana 10 de gestación se podrá utilizar el gen SRY con una sensibilidad prácticamente del 100% (42).

En el caso de detectarse la presencia de estas secuencias, el feto será un varón y, por el contrario, su ausencia determinará el sexo femenino. No obstante, se puede obtener un resultado falso negativo debido a errores en el proceso de amplificación de ADN fetal o

a que la concentración de este no sea óptima. Para evitar estos falsos negativos es preciso determinar de forma simultánea la presencia de DNA fetal LIBRE.

La importancia del conocimiento del sexo fetal radica en la posibilidad de detectar enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, tal y como se ha indicado previamente (ver Figura 14). Algunos ejemplos son la hemofilia, el raquitismo o la distrofia muscular de Duchenne. Además, también es útil para el diagnóstico de la hiperplasia adrenal congénita, que puede ser tratada de forma prenatal, lo cual consistirá en la administración de dexametasona a la madre durante las primeras semanas de embarazo. Esta atraviesa la placenta y tiene como objetivo frenar la hiperproducción androgénica (44).

## 2. Determinación del fenotipo RhD fetal

Los genes RHD y RHDE codifican los antígenos del sistema Rh. La determinación de la presencia o ausencia de estos es de suma importancia en la práctica clínica.

Es preciso realizarlo en los embarazos de gestantes RhD (-). En el caso de que el padre sea RhD (+) heterocigoto, las posibilidades del feto de ser RhD (+) son del 50%. Si esto ocurre, existe riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido. Se produce tras una sensibilización previa de la gestante (aloimmunización), debido a la incompatibilidad de grupo entre la madre y el feto, produciendo anticuerpos antiD que pueden atravesar la placenta causando esta enfermedad potencialmente mortal.

Por ello, la profilaxis se basa en la administración de inmunoglobulina antiD a gestantes RhD (-), ofreciéndose en nuestro país a todas ellas, a pesar de que un porcentaje significativo finalmente portará fetos RhD (-). La técnica de secuenciación de ADN fetal en sangre materna permite por lo tanto determinar con exactitud qué mujeres gestantes necesitan realmente la administración de la inmunoglobulina.

El análisis en laboratorio mediante el ADN fetal circulante se puede obtener tanto de plasma como de suero materno. No existe un consenso preciso del momento del embarazo en el que realizar la determinación. La técnica empleada de elección es la RT-PCR (PCR en tiempo real). En cuanto a la interpretación de los resultados obtenidos, un feto se clasificará como positivo si amplifica cualquiera de los exones del gen RHD. En caso contrario se considerará RhD (-). Si los resultados no fueran concluyentes se clasifica al feto como positivo, administrando la inmunoprofilaxis a la madre.

## 3. Enfermedades monogénicas con un patrón de herencia dominante

La técnica de diagnóstico prenatal no invasivo basada en el análisis de ADN fetal en sangre materna también permite la detección de enfermedades de herencia dominante, basándose en el criterio de presencia/ausencia del alelo mutado en el plasma de la madre (siempre que no sea la madre la afectada por esa enfermedad de herencia dominante). Si el padre del feto fuera portador de una enfermedad con tipo de herencia dominante debida a una mutación puntual en un determinado gen, al determinar la ausencia de la mutación en el genoma materno podríamos también descartarla en el feto.

Se han llevado a cabo diversos estudios en este ámbito diagnóstico. Algunas de las enfermedades estudiadas son:

- **MEN2A**, corresponde a Neoplasia Endocrina Múltiple, causada por la existencia de una mutación del protooncogén c-RET tirosin-kinasa localizada en el cromosoma 10q11.2. La herencia es de tipo autosómica dominante. Su diagnóstico se basa en la detección de la mutación, en concreto la mutación C634Y situada en el exón 11 perteneciente al protooncogén c-RET. En este caso el estudio se realizó con una técnica de COLD-PCR y HRM (del inglés High Resolution Melting). La técnica COLD-HRM es una variante del análisis HRM que emplea en una segunda fase de PCR la temperatura “*melting*” como temperatura de desnaturalización. Se utiliza para detectar las variantes genéticas que están en baja proporción en la muestra. Se llega a detectar ADN mutado que se encuentra incluso al 2% respecto al silvestre, por lo que es una técnica apta para diagnóstico no invasivo de variantes puntuales fetales ausentes en la madre. HRM: técnica de biología molecular basada en el estudio y comparación de curvas de fusión de las cadenas de ADN (42).
- **Corea de Huntington**. Esta enfermedad se caracteriza por un fenómeno de expansión de tripletes, en concreto del triplete CAG cuya posición se encuentra en el exón 1 del gen IT15. Es una enfermedad neurodegenerativa de instauración progresiva, que puede cursar con síntomas motrices, cognitivos y psiquiátricos. La gravedad de la misma se asocia al número de repeticiones de tripletes, estableciéndose la presencia de hasta 27 repeticiones en pacientes sanos. Los pacientes que portan entre 27-35 repeticiones son meioticamente inestables y cuando el número de repeticiones oscila entre 36-39 se manifiesta la enfermedad, pero con un fenómeno que se conoce como penetrancia incompleta. En el caso de que las repeticiones superen las 40 la penetrancia será completa.
- **Acondroplasia**. Esta enfermedad se ha asociado a una avanzada edad paterna, especialmente mutaciones ex novo. Puede sospecharse la afectación fetal mediante una ecografía realizada en el 2º o 3º trimestre de embarazo gracias a parámetros tales como la desproporción en el crecimiento de los miembros, así como una metáfisis amplia, pelvis anormal con alas ilíacas pequeñas y cuadradas, entre otros. En la mayor parte de los casos la mutación se produce en el gen FGFR3 con un tipo de herencia autosómica dominante (45).

#### 4. Enfermedades monogénicas con un patrón de herencia recesiva

En el caso de este tipo de enfermedades es necesario que las mutaciones que presenten cada uno de los progenitores sean diferentes, identificando así la de origen materno. Se utiliza el criterio de presencia/ausencia. Si la mutación de origen paterno no está presente, la conclusión es que el feto no estará afecto. Sin embargo, no se puede determinar si es portador de la misma. Por lo tanto, en caso de ausencia de la mutación de origen paterno y con las conclusiones a las que se llega (feto no afecto) se puede evitar la realización de técnicas invasivas.

Puede ocurrir que la mutación paterna sea detectada (presencia de esta). En este caso sí que sería necesario realizar una técnica invasiva, ya que no es posible sin la misma determinar si el feto está sano o es un portador. Dependerá de si ha heredado o no la mutación por parte de la madre y no es posible conocer este dato debido a la existencia de ADN materno en la muestra.

Dentro de las posibles enfermedades de herencia recesiva identificables destacamos la fibrosis quística, la betatalasemia, hiperplasia adrenal congénita, entre otras (41).

#### 5. Secuenciación del exoma

A diferencia de lo expuesto en los apartados anteriores, en los que se amplificaba y secuenciaba un gen concreto al conocer que uno de los progenitores (o ambos) eran portadores de una mutación asociada a la aparición de una determinada enfermedad, en este caso se trata de analizar todo el exoma en busca de posibles mutaciones, pero sin un conocimiento previo de una determinada mutación presente en el genoma de los progenitores. De esta forma, no se secuencian un único gen, sino todo un exoma.

Ahora mismo, este tipo de análisis sólo se realiza en el ámbito de la investigación, ya que la presencia de ADN materno en la muestra hace muy difícil la interpretación de los resultados.

#### 4.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUE REQUIEREN PRUEBAS INVASIVAS:

En este tipo de pruebas es necesario acceder al medio interno fetal para la toma de la muestra. Esta se puede obtener de la placenta mediante una biopsia de vellosidades coriales, de células fetales presentes en el líquido amniótico mediante una amniocentesis, o directamente de sangre fetal, habitualmente mediante el acceso a vasos del cordón umbilical o cordocentesis (46).

Los riesgos de este tipo de procedimientos son diversos, siendo el de mayor relevancia la pérdida fetal, teniendo además sus complicaciones, por lo que al realizarse se valorará la adecuada indicación. No obstante, se ha evidenciado que las pérdidas fetales se asocian en su mayoría al motivo por el cual estaba indicada la realización de una prueba invasiva. Se estima que el riesgo global de pérdida gestacional es de 1/100. Las pérdidas debidas a la técnica en Amniocentesis y Biopsia de Vellosidades coriónicas es aproximadamente 1/500 (47). En contrapartida, encontramos ventajas en la realización de este tipo de pruebas tales como la gran fiabilidad diagnóstica, la obtención de cariotipos de fácil interpretación y la posibilidad de diagnóstico de un espectro más amplio de enfermedades.

- **Amniocentesis:** técnica basada en la obtención de líquido amniótico de la cavidad uterina que se puede realizar a partir de la semana 15 (46).
- **Biopsia de vellosidades coriónicas:** su utilidad es similar a la anterior. Se puede realizar por vía transabdominal o vía transcervical. Se recomienda realizarla entre las 10 y 14 semanas de embarazo (48).

- **Cordocentesis:** obtención de sangre fetal mediante punción del cordón umbilical, presenta un riesgo de aborto mayor que las anteriores. Puede realizarse a partir de la semana 18 (46).

Biopsia corial	Amniocentesis
Puede realizarse desde etapas muy tempranas del embarazo. Esto permite tranquilizar a los padres pronto cuando el resultado es normal y una interrupción más precoz y segura del embarazo en caso de anomalía fetal	Mayor sencillez técnica
Se complementa perfectamente con el cribado combinado del I trimestre	Gran experiencia clínica
Proporciona con gran rapidez los resultados	Gran fiabilidad diagnóstica, producto de la amplísima experiencia que los laboratorios de genética acumulan con esta técnica
Es superior a la amniocentesis para análisis de ADN y estudios bioquímicos	Proporciona cariotipos de más fácil interpretación
Puede realizarse tanto transabdominal como transcervical, lo cual le proporciona una gran versatilidad	Es útil para el diagnóstico de un espectro más amplio de enfermedades fetales
Fácil aprendizaje en abortos diferidos, antes de legrado evacuador	

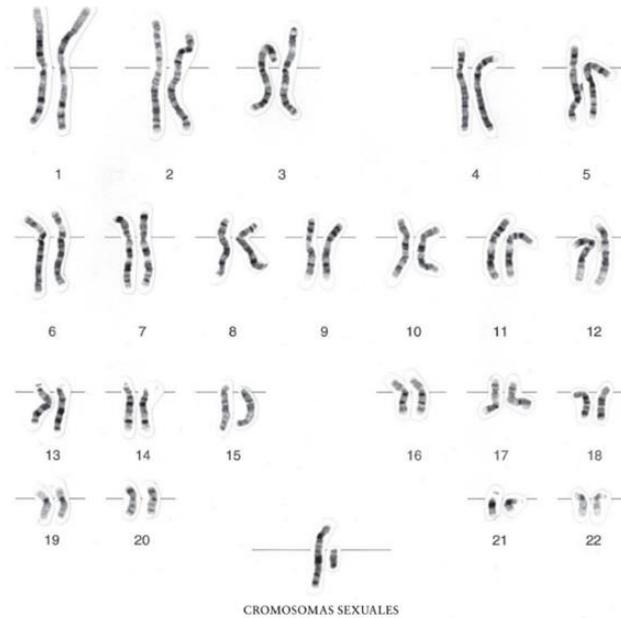
**Figura 26.** Principales ventajas de las técnicas invasivas de biopsia de vellosidades coriónicas y amniocentesis (49).

Una vez obtenido el material genético con cualquiera de las técnicas anteriores, se puede aplicar al mismo diferentes estudios, en función de lo que se desea conocer.

#### 4.2.1. Obtención de un cariotipo por cultivo

Mediante la muestra adquirida con alguna de las técnicas explicadas anteriormente se obtiene el cariotipo fetal, es decir, la dotación cromosómica del feto, mediante el cual se pueden detectar variaciones tanto en el número como en la estructura de los cromosomas (50). Para su obtención es preciso cultivar las células de la muestra fetal obtenida. Posteriormente, es preciso detener el proceso de mitosis celular en metafase, en la que los cromosomas se encuentran en su máximo grado de compactación y pueden ser visualizados. Se añade una solución hipotónica y se procede a la fijación celular.

La resolución de la técnica se encuentra en torno a 5 Mb, por lo que las anomalías causadas por una alteración de tamaño menor no podrán ser identificadas. Actualmente existe lo que se conoce como cariotipo de resolución alta, donde la detención de la mitosis se realizará en prometafase.

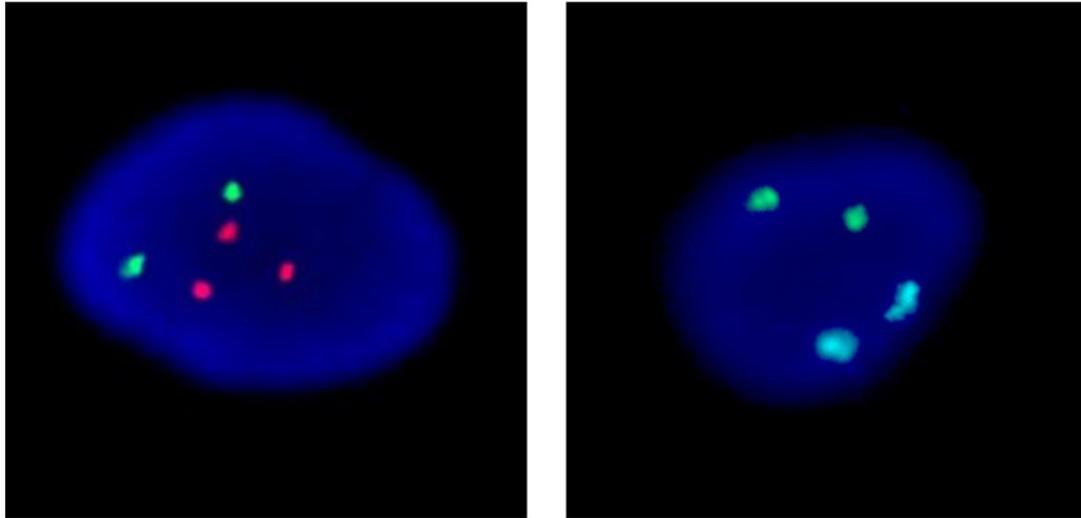


**Figura 27:** Ejemplo de un cariotipo del sexo masculino teñido con la técnica Giemsa. Los cromosomas corresponden a la prometafase de la mitosis. Están dispuestos en clasificación estándar y aparecen numerados del 1 al 22. Los cromosomas sexuales se corresponden con los cromosomas X e Y (17).

#### 4.2.2. Técnica FISH: hibridación fluorescente in situ

Permite detectar la presencia de una secuencia de ADN específica en un cromosoma y el número de copias de un gen. Es decir, permite la identificación de duplicaciones, deleciones, traslocaciones, aneuploidías... Para ello se utilizan cromosomas en interfase o en metafase. La resolución de la técnica se sitúa en torno a 500 kb en cromosomas en metafase. (51)

Como paso previo requiere el diseño de una secuencia de ADN que se marca con una sonda fluorescente. Esta secuencia ha sido diseñada de tal manera que sea complementaria a la secuencia de estudio. Se incuba con la muestra a analizar y se une (hibrida) a su complementaria, pudiendo detectarse por la emisión de fluorescencia. Revela así información acerca de la localización y número de copias de la secuencia objeto de estudio (52, 31).

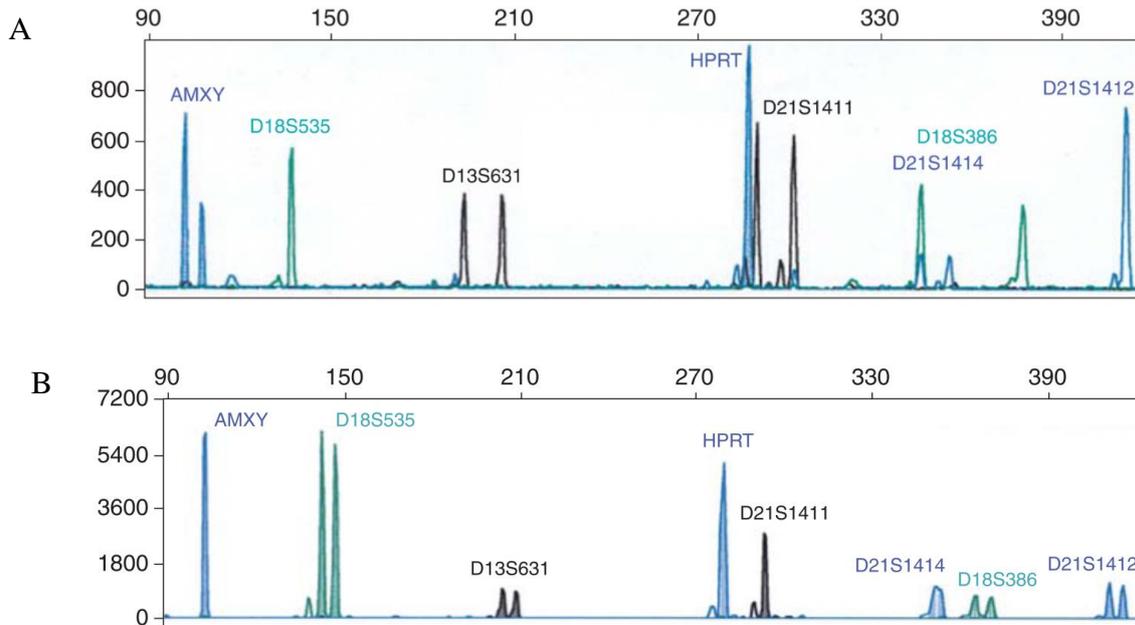


**Figura 28.** Prueba FISH en interfase. Se muestra un feto femenino afecto de trisomía del cromosoma 21. En la imagen de la izquierda el núcleo se ha hibridado con sondas para los cromosomas 13 (verde) y 21 (rojo). Tiene tres señales rojas, lo que implica la presencia de 3 copias del cromosoma 21. En la figura de la derecha el núcleo se ha hibridado con sondas para los cromosomas 12 (azul claro), X (verde) e Y (rojo). Al haber dos señales verdes y ninguna señal roja, el sexo del feto es femenino (XX) (53).

#### 4.2.3. QF-PCR

Técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa, que permite la amplificación de secuencias genómicas repetidas que se localizan en determinados cromosomas susceptibles de ser estudiados. Una de las aplicaciones de esta técnica en el diagnóstico consiste en la amplificación de secuencias STR (short tandem repeats), altamente polimórficos. Son fragmentos cortos, de entre 2 y 6 nucleótidos, que se repiten un número variable de veces, una tras otra, lo que constituye un elemento diferenciador entre alelos (54). La utilización de STRs permite determinar el número de alelos presentes, estableciendo así el número de cromosomas de cada célula. En la amplificación de estas secuencias se utilizan primers marcados fluorescentemente, de forma que el producto puede ser visualizado y cuantificado en función del área del pico obtenido por secuenciación automática. De esta forma, un individuo con un cariotipo normal, heterocigoto, presentará dos alelos con diferente número de repeticiones (dos picos distintos con la misma área). Un individuo con trisomía, por el contrario, presentará tres picos o bien dos picos, pero uno de ellos con el doble de área.

En la práctica clínica se puede utilizar tanto en el estudio de ambos cromosomas sexuales (X e Y), como de los autosomas 13, 18 y 21, permitiendo su cuantificación. Es por lo tanto muy útil como método diagnóstico de aneuploidías y triploidías de los cromosomas mencionados (46). No obstante, su precisión es menor a la del cariotipo e impide estudiar la dotación cromosómica completa del feto. En cuanto a sus ventajas destaca la posibilidad de automatización de la técnica y la velocidad de diagnóstico. Además, no precisa cultivo de la muestra y detecta la contaminación materna (presencia de material genético procedente de la madre en la muestra fetal).



**Figura 29.** Técnica QF-PCR aplicada al estudio de STRs. El eje X muestra la longitud de los productos de PCR en pares de bases, el eje Y muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. AMXY corresponde a una secuencia presente en ambos cromosomas (X e Y), pero de diferente tamaño en ambos. HPRT es un marcador del cromosoma X. (A), caso sospecha de Síndrome de Klinefelter 47, XXY. AMXY se muestra en una proporción de 2:1 para X:Y, lo que indica cariotipo XXY. En este caso, el marcador HPRT no es informativo, ya que se encontraría en homocigosis (B) caso sospecha de cariotipo 45X (Síndrome de Turner). Se muestra el ADN amplificado con un solo pico para AMXY y otro para HPRT, pero es difícil diferenciar entre mujer homocigota para ambos marcadores y un Síndrome de Turner, es preciso confirmar con marcadores adicionales. El resto de marcadores utilizados corresponden a secuencias STR presentes en los cromosomas 13, 18 y 21 (D13..D18...D21...) (55).

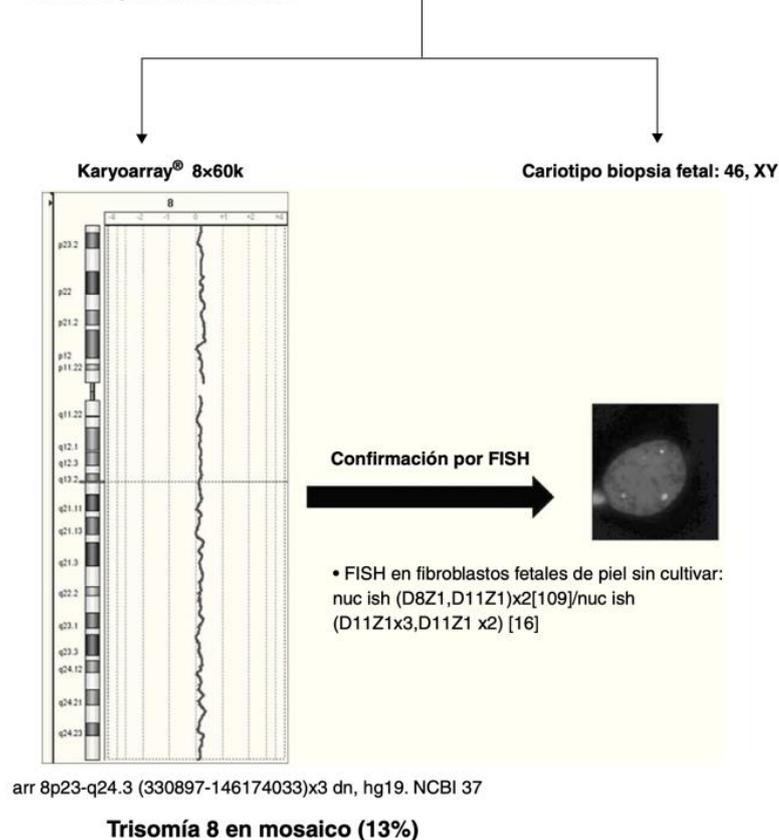
#### 4.2.4. Microarray

Los arrays son dispositivos creados para la inmovilización de miles de fragmentos de ADN de pequeño tamaño o de sondas en un soporte sólido (56). Por lo tanto, la técnica denominada microarray genómico/cromosómico o cariotipo molecular se basa en la hibridación sobre una matriz de sondas/fragmentos de ADN que “interrogan” varios loci distribuidos por el genoma. Hay diversas variantes y resoluciones, situándose esta última en niveles entre 10 y 1.000 veces superiores al cariotipo convencional. Además, el tiempo de respuesta es menor ya que en la mayoría de los casos no es necesario el cultivo de células. Permite la detección de ganancias y pérdidas de material genético (57). En función de la sonda y el tipo de microarray distinguimos:

- **Array-CGH:** técnica basada en una hibridación genómica competitiva entre el ADN fetal y un ADN que ejerce de control, en una matriz compuesta por sondas de ADN. Se basa en la comparación de la cantidad de ADN de la muestra con un control. Ambos DNAs marcados con fluorescencia de colores distintos se hibridarán con las sondas inmovilizadas del soporte.

El análisis del color de cada punto determina la cantidad (relativa) de ADN del paciente y del control, permitiendo la detección de ganancias y pérdidas de material genético (variantes en el número de copias, deleciones, duplicaciones...) (56). Estas ganancias y pérdidas de material genético se detectan con mayor precisión que mediante la técnica de cariotipo, con el inconveniente de la incapacidad para detectar anomalías equilibradas (traslocaciones e inversiones) (58).

**Indicación: Alteraciones ecográficas: Agenesia del cuerpo calloso, colpocefalia, dilatación pielocalicial bilateral**



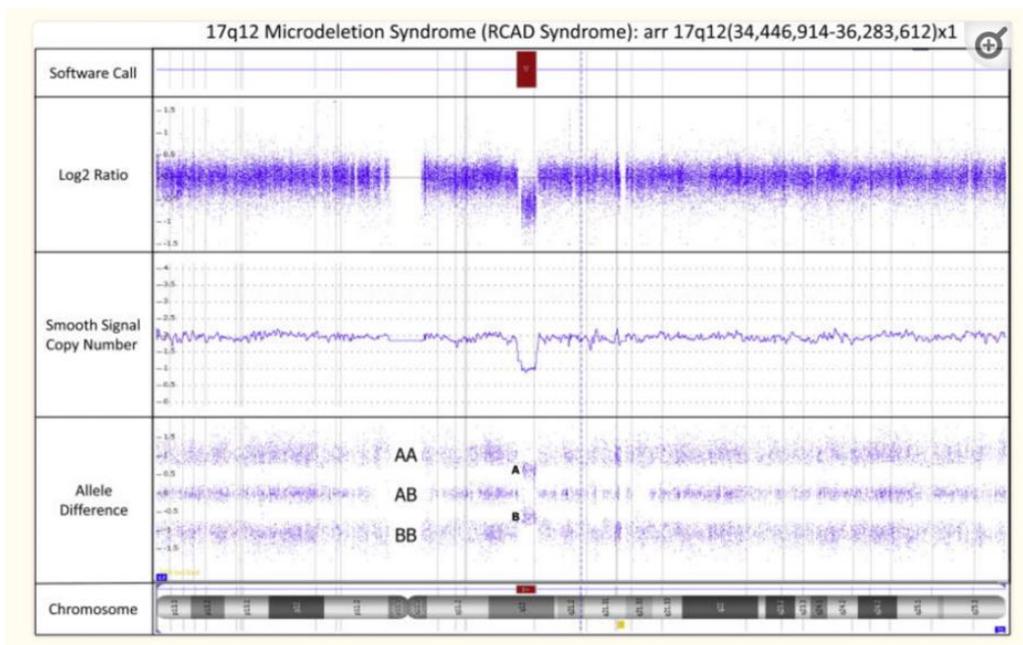
**Figura 30.** Array-CGH mostrando una trisomía en el cromosoma 8, posteriormente confirmada por FISH. En este caso la trisomía no afecta a todo el material genético, sino que lo hace en forma de mosaico. A la izquierda de la imagen donde se representa la técnica Array-HCG, la línea vertical que corresponde con la cantidad de material genético de esa región está ligeramente desviada a la derecha respecto a la línea que marca el 0 (cantidad de material genético normal) lo que implica que hay una mayor cantidad de material genético que en un cromosoma normal. Además, mediante la técnica FISH se identifican tres puntos correspondientes con el cromosoma 8 (59).

- **SNP-array:** en este caso el término SNP hace referencia a *Single Nucleotide Polymorphims*, ya que de estos estará compuesta la matriz. La técnica se basa en la comparación de la intensidad de hibridación del ADN fetal con un control, permitiendo detectar cambios de un solo nucleótido. Tiene una elevada sensibilidad, posibilitando la detección de mutaciones puntuales. Además, pueden detectar zonas del genoma asociadas a imprinting (57, 30).

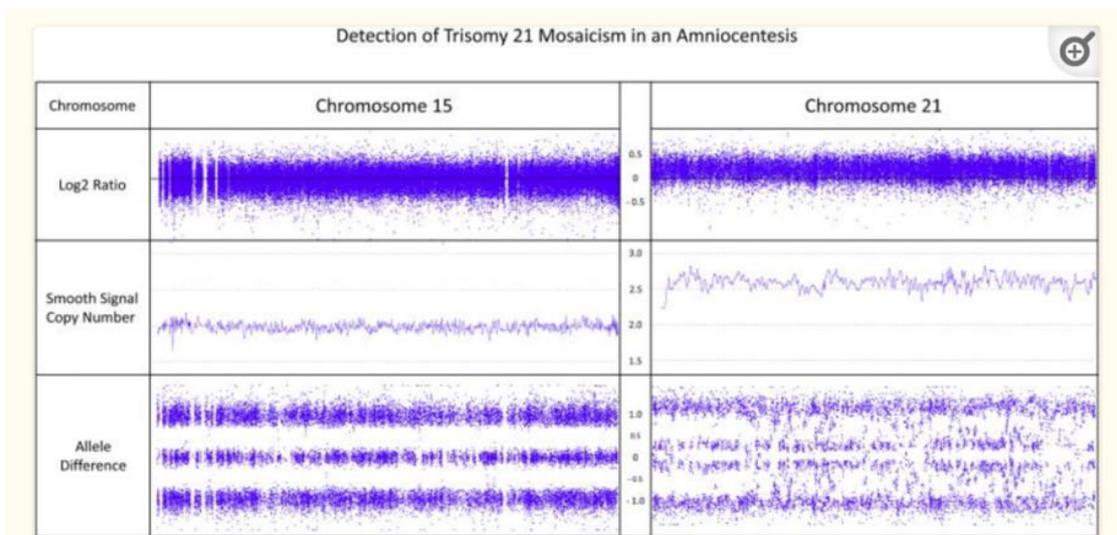
Los arrays pueden clasificarse también en función de la disposición de las sondas de ADN:

- **Microarray dirigidos:** en este caso las sondas se dirigen en su totalidad a regiones cromosómicas responsables de trastornos conocidos.
- **Microarray de genoma completo,** en el que las sondas de ADN se distribuyen uniformemente.
- **Microarray mixtos,** los de mayor utilidad en el ámbito del diagnóstico prenatal. Formados por una mezcla de sondas distribuidas por todo el genoma y una densidad aumentada de estas en las regiones cromosómicas asociadas a trastornos de etiología conocida (57).

Su utilidad en el diagnóstico prenatal se basa en la posibilidad de detección de microdeleciones y microduplicaciones consideradas crípticas (aquellas de tamaño menor de 10 Mb), además de aneuploidías, deleciones y duplicaciones. No obstante, no es capaz de determinar anomalías equilibradas ni algunas triploidías (46). A continuación, se muestran algunos ejemplos:



**Figura 31.** Array CGH utilizado para detectar una microdelección en la región proximal del brazo largo del cromosoma 17, asociada a diagnóstico de quistes renales y diabetes, por la pérdida del gen *HNF1B*. La deleción viene determinada por una disminución en Log2. En el panel de número de copias ("smooth signal copy number") se indica el número de copias de cada sonda y es útil para identificar el mosaicismo. El panel de diferencia de alelos indica el genotipo de cada sonda SNP. El idiograma cromosómico indica la posición de la deleción (60).



**Figura 32.** CGH- array En la detección de una trisomía del cromosoma 21. En la parte derecha de la imagen se encuentra representado el cromosoma 21 donde vemos un aumento de la señal del número de copias (gráfico del medio) (60).

#### 4.2.5. NGS/Next Generation Sequencing

Tal y como se ha mencionado en el apartado 4.1.2, se basa en la secuenciación de todo el genoma completo, en concreto de millones de fragmentos de ADN de pequeño tamaño en paralelo, realizando una alineación posterior con un genoma de referencia para poder comparar (56). Sus aplicaciones en el ámbito clínico son múltiples.

Existen diferentes tipos de técnicas de secuenciación, resumidas en la siguiente tabla (Figura 33).

SECUENCIACIÓN CLÁSICA		
Sanger		Secuencias de 500 a 100 pares de bases (una secuencia de un solo individuo a la vez). Paralelización 96x.
MPS (MILLONES DE SECUENCIAS EN PARALELO)		
Lecturas cortas	illumina	Secuencias de entre 75 y 150 pb. Error aleatorio, pero según secuenciador (los que usan dos colores) mayor sesgo en llamado de Gs y problemas con regiones ricas en AT y GC.
	Ion torrent	Secuencias entre 200 y 400 pb. Mayor tasa de error en homopolímeros.
Lecturas largas	PacBio	Secuencias de entre 8 y 30 Kb. Tasas de error bajas a 1% con muchos pases de la misma secuencia (circular consensus read).
	Oxford nanopore	Secuencias de 200 Kb (en continua mejora). Tasa de error entre un 2 y un 10% según metodología.
	Lecturas largas sintéticas	Secuencias 'ligadas' de longitud virtual de 100 Kb. Uso de código de barras únicos para fragmentos largos antes de fraccionamiento para preparar la genoteca y 'unir sintéticamente' las lecturas. 10X Genomics.

**Figura 33:** Técnicas de secuenciación, incluye la secuenciación clásica basada en el método Sanger y la secuenciación de millones de secuencias en paralelo. En esta última se incluyen las lecturas cortas y las lecturas largas (61).

Al secuenciar en paralelo es posible cuantificar el número de lecturas de un alelo concreto. Por ejemplo, en casos de heterocigosis debe de existir aproximadamente el 50% de lecturas de cada alelo.

Se puede secuenciar la totalidad del genoma del feto, o bien solo el exoma. En cuanto al análisis del exoma, éste hace referencia a las regiones codificantes y reguladoras de los genes funcionales, lo que constituye un 1-1,5% del genoma. La secuenciación de este exoma es de utilidad para la determinación de mutaciones responsables de enfermedades mendelianas. Por lo tanto, se indica para la detección de mutaciones causantes de enfermedad con gran heterogeneidad fenotípica y/o genética.

Existe la posibilidad de crear paneles personalizados específicamente según la patología. Hay paneles de captura para enfermedades que pueden detectarse con esta técnica, aunque posee ventajas y limitaciones; las primeras incluyen el bajo coste por base secuenciada, una elevada precisión, interpretación de resultados y bajo riesgo de hallazgos de significado incierto. Sin embargo, entre las limitaciones de la técnica se encuentra la imposibilidad de búsqueda de nuevos genes responsables de la enfermedad sin rediseñar previamente el procedimiento (40).

Existen diversos paneles genéticos que pueden ser utilizados. A estos se pueden sumar análisis de microarrays cromosómicos, así como otros métodos especialmente útiles en aquellas anomalías de carácter heterogéneo. La aplicación de los paneles permite analizar cifras entre 150 - 5000 genes simultáneamente y, en relación al número de variantes, oscila en unas 2 o 3 variantes por gen presente en el panel. En cambio, en el caso del análisis del exoma completo la cantidad de genes es de unos 20.000, lo que supone unos 180.000 exones (ya que la proporción es de unos 9 exones en cada gen). En cuanto a las variantes son 30-50000. Si hablamos del análisis del genoma completo la información en cuanto a genes se refiere se multiplica por 50 respecto al anterior y el número de variantes asciende a 3-4 millones.

Panel	Exoma
Coste inferior	Implementación metodológica -Bioinformáticos -Algoritmo complejo -Equipamiento
Tiempo análisis: Interpretación variantes acotada a genes relacionados con la patología	El tiempo de análisis es una limitación seria para la implementación de WES en rutina diagnóstica. Captura indiscriminada
Actualización continua: De media 36% en los 3 últimos años	Paneles virtuales: Actualizaciones modificando algoritmo de análisis.
Profundidad de lectura	Optimizar backbone exoma mediante enriquecimiento de regiones relevantes.
Identificación variantes estructurales	No optimizada.

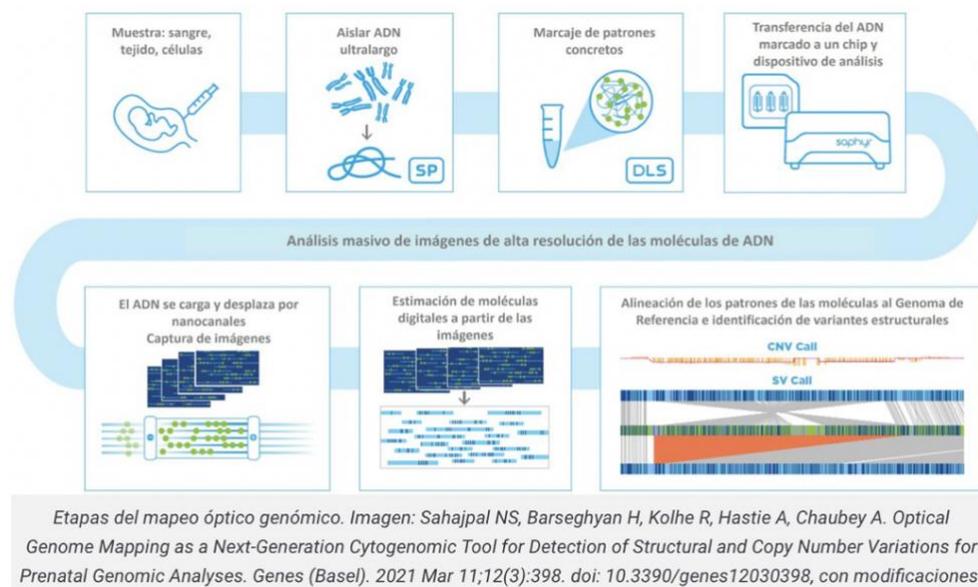
**Figura 34:** comparación entre la secuenciación de paneles y secuenciación del exoma completo. En lo referente a la secuenciación de paneles el coste de la prueba es menor, además de permitir la identificación de variantes estructurales (40).

En estos momentos, el análisis del genoma completo no se emplea de forma rutinaria en el diagnóstico prenatal, ya que el número de variantes de significado incierto que aparecen es muy elevado y es imposible dar un diagnóstico asociado a dichas variantes/mutaciones. Es de esperar que cuando consigamos un mayor conocimiento de nuestro genoma y de todas las variantes asociadas a enfermedades, este tipo de análisis sea de una enorme utilidad en el diagnóstico.

#### 4.2.6. Mapeo óptico del genoma

Es la técnica más novedosa que se ha demostrado útil para identificar anomalías cromosómicas (62). Permite detectar alteraciones cromosómicas de más de 500 pares de bases, obteniendo imágenes de moléculas de ADN individuales, lineales, que son marcadas en determinadas posiciones. De esta forma, detecta la presencia tanto de anomalías numéricas (inserciones, deleciones, duplicaciones, traslocaciones e inversiones), además de anomalías estructurales en un solo ensayo. Esto conlleva la creación de un mapa que cubre el brazo entero de un cromosoma y permite detectar inserciones y eliminaciones de un tamaño pequeño (62, 63).

Se basa en la hibridación sobre fragmentos largos de ADN procedentes del paciente con sondas marcadas fluorescentemente, de colores diferentes, que se unirán a diversas localizaciones del genoma. Al existir variaciones de las secuencias a lo largo del genoma, también lo harán el color, orden y número de sondas hibridadas de una región a otra. Como resultado, se obtendrá un “código de barras” que mediante su análisis permitirá determinar la presencia o ausencia de las anomalías explicadas (56). Esta técnica se ha utilizado con éxito en la determinación de puntos de ruptura de traslocaciones, diagnóstico de enfermedades neuromusculares, además de en el diagnóstico prenatal.

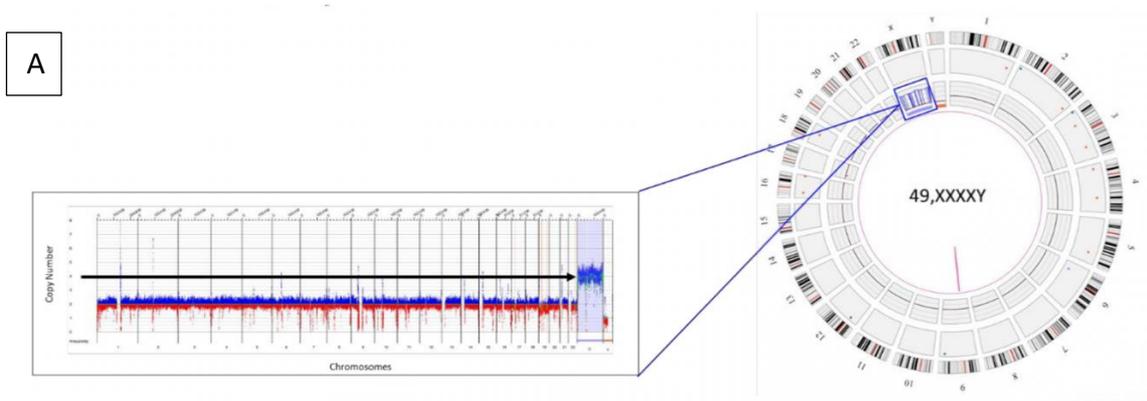


**Figura 35:** Explicación de los pasos de la técnica “mapeo óptico del genoma”. El proceso comienza con la obtención de una muestra y aislamiento del ADN. Posteriormente se realiza el marcaje y se transfiere marcado a un chip y dispositivo de análisis. El ADN se carga y desplaza por nanocanales, obteniéndose imágenes a partir de las cuales se realiza una estimación de moléculas. Finalmente se alinean con el genoma de referencia y se identifica la presencia o ausencia de variantes (64).

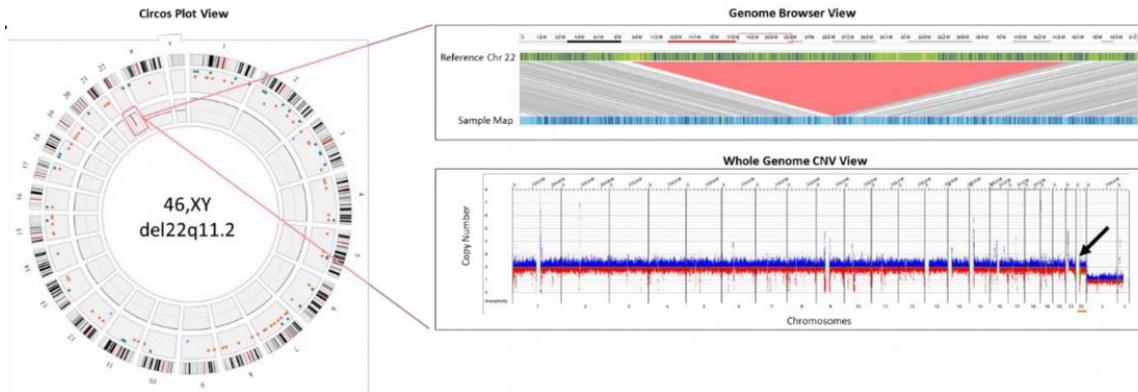
La técnica necesita una concentración de ADN mínima, que debe ser mayor de 35 ng/microlitro (65). Se lleva a cabo mediante el marcaje fluorescente de una región de ADN, en concreto de una secuencia de seis pares de bases (CTTAAG). Esta secuencia aparece entre 14 y 17 veces cada 100 kbases, con variaciones en función del genoma en el que nos encontremos. Posteriormente estas secuencias marcadas se introducen en un aparato llamado Saphyr (64), en el que se lleva a cabo una electroforesis de estas moléculas de ADN. Con la utilización de un microscopio de fluorescencia se pueden analizar los resultados. Los fragmentos de ADN se alinean y ensamblan, obteniendo así un patrón genómico específico.

Por último, el patrón obtenido se compara con los de referencia. Uno de ellos permite identificar las anomalías estructurales y otro las numéricas, pudiendo llegar a detectar ganancias y pérdidas de cientos de kilobases, así como duplicaciones y traslocaciones mayores de 30 kb (47). Existe actualmente una base de datos, donde se recoge información de individuos sanos con la que se podrán comparar las muestras obtenidas, pudiendo detectar aquellas muestras posiblemente patogénicas. Además, la rapidez de la técnica es clara, pudiéndose realizar en su totalidad en unos 3 días. No obstante, se trata de una técnica novedosa, por lo que la información y las utilidades de esta no son todavía muy extensas.

A continuación, se exponen varios ejemplos de variantes estructurales obtenidos mediante la aplicación de la técnica. El círculo exterior corresponde a las ubicaciones de las citobandas en los cromosomas. El círculo del medio, en función del color, determina variantes estructurales detectadas en esas localizaciones concretas. El círculo interno hace referencia a los cambios en el número de copias de cada cromosoma o región. En el caso de presencia de traslocaciones estas están representadas como líneas en el centro que conectan con los loci genómicos involucrados.

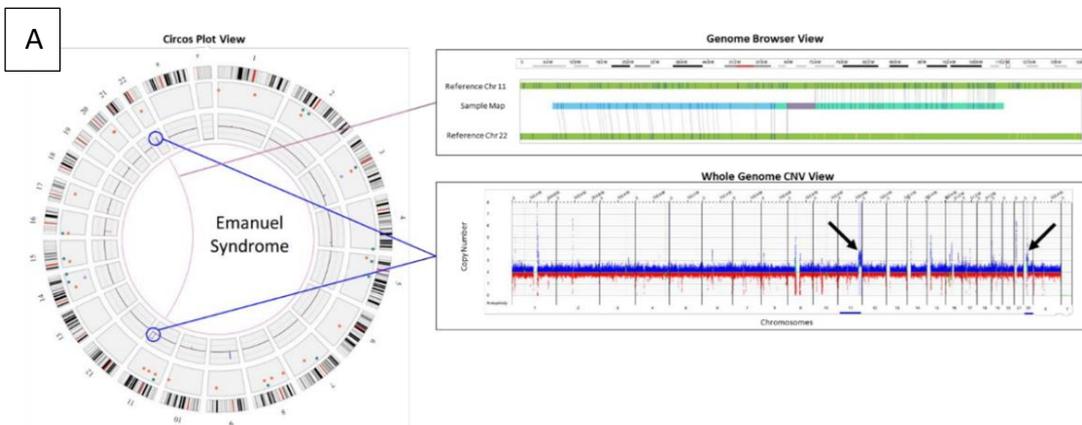


**Figura 36.** (A) Ejemplo de un análisis por mapeo óptico. A la derecha de la figura se representa el diagrama de círculos. El cuadro azul hace referencia a la ganancia de secuencia del cromosoma X. A la izquierda se representa el gráfico con las lecturas para cada uno de los cromosomas, en el eje X están representados los cromosomas, en el eje Y el número de copias. La flecha negra indica una ganancia del cromosoma X, en concreto de 4 copias (65).



**Figura 37:** Ejemplo 2 de un análisis de mapeo óptico. La figura de la izquierda se corresponde al diagrama de círculos, donde están representadas las variantes estructurales (en el círculo medio), en este caso en naranja está señalada una deleción patógena, en concreto del cromosoma 22. En referencia a los paneles de la derecha; en el superior la variación estructural, la barra verde corresponde al mapa de referencia del cromosoma 22 y la azul a la muestra. Al compararlas se detecta una deleción (área roja). En el panel inferior en el eje X están representados los cromosomas, en el eje Y el número de copias; la región señalada por la flecha muestra la pérdida en el cromosoma 22 (65).

En este caso, el análisis de la muestra indicada en la figura 37 permite el diagnóstico de un **Síndrome de Di George**, que constituye la causa de microdeleción más frecuente, con una incidencia de 1:4000 nacimientos. Se produce debido a la eliminación de una región del cromosoma 22 (22q11.2), de unas 3 Mb.



**Figura 38.** (A) Ejemplo de un análisis mediante la técnica de mapeo óptico del genoma. En el diagrama de la izquierda están señalados en azul los cromosomas 11 y 22 debido a la presencia de ganancias de CNV (variación del número de copias). La línea restante señala la presencia de una traslocación entre ambos cromosomas. En la figura superior derecha se representan los dos mapas de referencia de los cromosomas 11 y 22 y en medio (color azul) el de la muestra. En este último encontramos la presencia de la traslocación, ya que se alinean secuencias de los dos cromosomas estudiados. En la imagen inferior derecha en el eje X están representados los cromosomas, en el eje Y el número de copias, las flechas señalan la ganancia de material genético en ambos cromosomas 11 y 22 (65).

Por último, y a modo de resumen, se adjunta una tabla comparativa de las diferentes técnicas analizadas, con las principales ventajas y limitaciones en la detección de diferentes tipos de anomalías genéticas.

	Cario-tipo	FISH	MLPA	Arrays	NGS	NIPT	Optical mapping
Técnica diagnóstica	NO (1)	SI	SI	SI	NO (1)	NO	NO (2)
Resolución	~5-10 MB	~ 300 bp	300 bp (3)	~20-200 kb	~100 bp (exones)-150 kb (resto)	7 Mb	~500 kb
Detecta reorganizaciones equilibradas	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI
Detecta anomalías en todo el genoma	SI	NO	NO	SI	NO	NO	SI

**Tabla 1.** Comparación de diversas técnicas para la detección de CNVs.

(1) La clasificación se refiere a la detección de CNVs.

(2) El "optical mapping" es una técnica de muy reciente desarrollo aún en proceso de validación. Es altamente probable que se considere diagnóstica en una serie de escenarios muy en breve.

(3) Para descartar polimorfismos es necesario la detección de una anomalía con dos juegos independientes de sondas. Por tanto, una buena aproximación sería aproximadamente de unas 300 bp.

**Figura 39:** Tabla comparativa de las diferentes técnicas utilizadas para la detección de anomalías genéticas. Cariotipo, FISH, MLPA, Arrays, NGS, NIP. MLPA hace referencia a amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación, . El acrónimo NIPT hace referencia a las técnicas no invasivas (56).

## **5. CONCLUSIONES**

Los avances obtenidos en los últimos años en el ámbito del diagnóstico prenatal han permitido aumentar la tasa de detección de anomalías genéticas, no solo mediante la realización de pruebas invasivas, sino de otras clasificadas como no invasivas, asociadas a un menor riesgo y coste del procedimiento, permitiendo así una mayor accesibilidad por parte de la población.

La genética es un campo en constante crecimiento. Gracias a ello, el futuro próximo es prometedor, dejando la puerta abierta a la mejora de las técnicas, así como al diagnóstico de anomalías mediante procedimientos hasta ahora desconocidos, pudiendo incluso llegar a proporcionar un diagnóstico de certeza sin necesidad de asumir riesgos tales como la pérdida fetal. Es decir, sin recurrir a la realización de una prueba invasiva para la confirmación de una sospecha diagnóstica. No obstante, hoy en día aún sigue siendo necesario recurrir al diagnóstico mediante pruebas invasivas si el cribado por pruebas no invasivas así lo determina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Carolyn. Science and Nature: Past, Present, and Future. Londres, Inglaterra: Routledge; 2017.
2. Gelambi M. Aneuploidía [Internet]. Lifeder. 2023 [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/aneuploidia>.
3. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo PM, Valdespino-Castillo VE. Organización estructural y funcional del genoma humano: variación en el número de copias predisponentes de enfermedades degenerativas. Gac Mex Oncol [Internet]. 2013 [citado 20 de marzo de 2024];12(6):426-32. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-organizacion-estructural-funcional-del-genoma-X1665920113687258>.
4. M<sup>a</sup> Pilar Ribate Molina Feliciano J. Ramos Fuentes. Diagnóstico Prenatal [Internet]. Cedit.es. [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: [http://riberdis.cedit.es/bitstream/handle/11181/2965/Diagnostico\\_prenatal.pdf](http://riberdis.cedit.es/bitstream/handle/11181/2965/Diagnostico_prenatal.pdf).
5. Síndrome de Klinefelter [Internet]. MayoClinic.org. 2020 [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/klinefelter-syndrome/symptoms-causes/syc-20353949>.
6. Síndrome de Turner [Internet]. Mayo Clinic. 2022 [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/turner-syndrome/symptoms-causes/syc-20360782>.
7. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson y. L. Una revisión de la Trisomía X (47, XXX) [Internet]. Orpha.net. 2010 [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: [https://www.orpha.net/data/patho/Pro/es/TrisomiaX\\_OJRD\\_Spanish.pdf](https://www.orpha.net/data/patho/Pro/es/TrisomiaX_OJRD_Spanish.pdf).
8. 47, XYY syndrome [Internet]. Medlineplus.gov. [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/47xyy-syndrome>.
9. “Diagnóstico del síndrome de Klinefelter” [Internet]. Webconsultas.com. 2012 [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/sindrome-de-klinefelter/diagnostico-del-sindrome-de-klinefelter-7181>
10. Alamy Limited. Turner syndrome karyotype [Internet]. Alamy.com. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.alamy.com/stock-photo-turner-syndrome-karyotype-80335270.htm>
11. Alamy Limited. Xyy chromosome hi-res stock photography and images [Internet]. Alamy. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.alamy.com/stock-photo/xyy-chromosome.html?sortBy=relevant>

12. Alamy Limited. Triple X syndrome karyotype [Internet]. Alamy.com. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.alamy.com/stock-photo-triple-x-syndrome-karyotype-80335268.html>
13. Cariotipo de la trisomía 13 (síndrome de Patau, trisomía D) - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [citado 20 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/multimedia/image/cariotipo-de-la-trisom%C3%ADa-13-s%C3%ADndrome-de-patau-trisom%C3%ADa-d>.
14. Alamy Limited. Down syndrome karyotype [Internet]. Alamy.com. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.alamy.com/stock-photo-down-syndrome-karyotype-80335269.html>
15. Cariotipo síndrome de Patau [Internet]. Depositphotos. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://depositphotos.com/es/vector/patau-syndrome-karyotype-68702149.html>
16. Cariotipo síndrome de Edwards [Internet]. Depositphotos. [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://depositphotos.com/es/vector/edwards-syndrome-karyotype-68702147.html>
17. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine, 8e. Nueva Delhi, India: Elsevier; 2015
18. "Síndrome de cri du chat: Presentación de dos casos". Medigraphic.com. [citado 7 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2003/hg034g.pdf>
19. Ripollés GP. "El síndrome 22q11" [Internet]. Naukas. 2019 [citado 7 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://naukas.com/2019/11/06/el-sindrome-22q11/>
20. Suárez Ayala DV, del Castillo G, Velasco Y. "Cromosoma 13 en anillo, reporte de caso". Pediatría [Internet]. 2016;49(1):31-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcpe.2016.02.001>
21. Cuesta Hernández M, Rueda Valencia ME, Pérez Rodríguez O, López de Lara D. "Isocromosomas X: diagnóstico tardío de síndrome de Turner." An Pediatr (Barc) [Internet]. 2015;82(1):e131-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.02.020>
22. Diccionario de cáncer del NCI [Internet]. Cancer.gov. 2011 [citado 7 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cromosoma-filadelfia>
23. García-Pavía P, Segovia J, Molano J, Mora R, Kontny F, Erik Berge K, et al. "Miocardiopatía hipertrófica de alto riesgo asociada con una nueva mutación en la proteína C fijadora de miosina". Rev Esp Cardiol [Internet]. 2007 [citado el 17 de

- mayo de 2024];60(3):311–4. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-miocardiopatia-hipertrofica-alto-riesgo-asociada-articulo-13100284>
24. Garrigues F. “Fibrosis quística: características y herencia” [Internet]. Genotipia. 2024 [citado el 17 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://genotipia.com/fibrosis-quistica/>
  25. Masip MA. “¿Qué es la infertilidad masculina por microdeleciones en el cromosoma Y?” [Internet]. Reproducción Asistida ORG. 2023 [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/infertilidad-masculina-cromosoma-y/>.
  26. Cao L, Dong W, Wu Q, Huang X, Zeng X, Yang J, et al. Advanced maternal age: copy number variations and pregnancy outcomes. *Front Genet* [Internet]. 2023 [citado 15 de abril de 2024];14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2023.1206855>.
  27. EpData. Maternidad y paternidad, datos y estadísticas. 31 de diciembre de 2018 [citado 15 de abril de 2024]; Disponible en: <https://www.epdata.es/datos/maternidad-paternidad-datos-estadisticas/222?accion=1>.
  28. Saludcantabria.es. [citado 8 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://saludcantabria.es/uploads/Memoria%20PDPAC%202020.pdf>
  29. Kaltsas A, Moustakli E, Zikopoulos A, Georgiou I, Dimitriadis F, Symeonidis EN, et al. Impact of advanced paternal age on fertility and risks of genetic disorders in offspring. *Genes (Basel)* [Internet]. 2023 [citado 15 de abril de 2024];14(2):486. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/genes14020486>
  30. Prior-de Castro C, Gómez-González C, Rodríguez-López R, Macher HC. Diagnóstico genético prenatal de enfermedades monogénicas. *Adv Lab Med* [Internet]. 2023 [citado 15 de abril de 2024];4(1):40-51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1515/almed-2022-0086>
  31. Cribado y diagnóstico precoz de anomalías genéticas [Internet]. Revista oficial de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia; Disponible en: <https://sego.es/documentos/progresos/v61-2018/n6/GAP-CRIBADO-%20250918.pdf>.
  32. “Exploración ecográfica del primer trimestre. Prog Obstet Ginecol “(Internet) [Internet]. 2015; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pog.2015.06.009>.
  33. Rodríguez PD. “Utilidad del ADN fetal en sangre materna para el cribado neonatal”. *FMC - Form Médica Contin Aten Primaria* [Internet]. 2020;27(8):411-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fmc.2019.12.008>
  34. de Salud SC. PROTOCOLO DE ATENCIÓN AL EMBARAZO Y PUERPERIO EN CANTABRIA. 2017.

35. Marina SP. ABORDAJE DE NUEVOS DIAGNÓSTICOS GENÉTICOS FETALES EN SANGRE MATERNA. Universidad Autónoma de Madrid; 2016.
36. Rodríguez de Alba M, Bustamante-Aragonés A, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J, et al. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. *Diagn Prenat* [Internet]. 2012;23(2):67-75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.002>.
37. Sistemática R. Detección de ADN fetal libre en sangre materna para diagnóstico prenatal de aneuploidías [Internet]. *Aetsa.org*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: [https://www.aetsa.org/download/publicaciones/antiguas/AETSA\\_2011\\_2\\_7\\_Diagnostico\\_aneuploidias.pdf](https://www.aetsa.org/download/publicaciones/antiguas/AETSA_2011_2_7_Diagnostico_aneuploidias.pdf).
38. Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones [Internet]. *Pediatría integral*. 2019 [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2019-07/nuevas-metodologias-en-el-estudio-de-enfermedades-geneticas-y-sus-indicaciones-2/>.
39. Manzano. HM. SECUENCIACIÓN MASIVA EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO [Internet]. *Seqc.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/25/5630/6279335/346228/cms/tema-6-secuenciacion-masiva-en-el-diagnostico-prenatal-no-invasivo.pdf/>.
40. Blanco JN. LA NGS Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL [Internet]. *Seqc.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/44/8037/731968456/1622713/cms/tema-8-la-ngs-y-su-aplicacion-en-el-diagnostico-prenatal.pdf/>.
41. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn Prenat* [Internet]. 2012;23(2):56-66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>.
42. Rosas. I. DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO [Internet]. *Seqc.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/13/4417/8014279/929070/cms/tema-7-diagnostico-prenatal-no-invasivo.pdf/>.
43. González. MS. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) [Internet]. *Seqc.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/25/5627/1559040346/826284/cms/tema-5-tecnicas-de-secuenciacion-masiva-ngs.pdf/>.
44. María Clemente León, Beatriz Puga González, Ariadna Campos Martorell, Diego Yeste Fernández. "Tratamiento prenatal de la HSC". Disponible en: <https://www.endocrinologiapediatrica.org/revistas/p1-e25/p1-e25-s1412-a456.pdf>. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Vall d'Hebron.; 2018.

45. "CÓMO SE DIAGNOSTICA LA ACONDROPLASIA" [Internet]. Fundacionalpe.org. [citado 20 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.fundacionalpe.org/es/medicina-y-ciencia/como-se-diagnostica-la-acondroplasia>.
46. Del Mar Gil Mira DM. "Técnicas invasivas en diagnóstico prenatal 2022" [Internet]. Segoes.es. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://sego.es/documentos/progresos/v66-2023/n2/05%20Tecnicas%20invasivas%20en%20diagnostico%20prenatal%202022.pdf>
47. Zhang Q, Wang Y, Xu Y, Zhou R, Huang M, Qiao F, et al. "Optical genome mapping for detection of chromosomal aberrations in prenatal diagnosis". *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2023 [citado 15 de abril de 2024];102(8):1053-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/aogs.14613>.
48. García-Posada R, Borobio V, Bennasar M, Illa M, Mula R, Serés A, et al. "Biopsia corial transcervical: guía práctica". *Diagn Prenat* [Internet]. 2012;23(1):2-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2011.11.007>.
49. "Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. *Diagn Prenat*" [Internet]. 2013;24(2):57-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2012.06.013>
50. María Moreno-Medical Science Liaison Manager. "¿Qué es el cariotipo?" [Internet]. Veritas Intercontinental. 2021 [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.veritasint.com/blog/es/que-es-el-cariotipo/>.
51. The-Hung Bui, Blennow E, Nordenskjöld M. "Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics". *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2002;16(5):629–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1053/beog.2002.0327>
52. "Hibridación fluorescente in situ (FISH)" [Internet]. Genome.gov. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>.
53. "Ejemplos de FISH de Interfase" [Internet]. Urv.cat. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.urv.cat/html/consellsocial/PQDocent/CD%20Libre%20Qualitat/material/cap06/contenido/biomodel/citogene/dynacare/intfish.htm>.
54. "Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales" [Internet]. Aetsa.org. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: [https://www.aetsa.org/download/5\\_AETSA\\_Utilidad-de-QF\\_PCR-en-el-diagnostico-prenatal-de-aneuploidias-feta\\_DEF\\_NIPO.pdf](https://www.aetsa.org/download/5_AETSA_Utilidad-de-QF_PCR-en-el-diagnostico-prenatal-de-aneuploidias-feta_DEF_NIPO.pdf).
55. Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. "Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods

- FISH and QF-PCR". *J Reprod Fertil* [Internet]. 2003 [citado 15 de abril de 2024];126(3):279-97. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12968936/>.
56. Sarret APRN. "EL DIAGNÓSTICO PRENATAL MEDIANTE ARRAY" [Internet]. *Seqc.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.seqc.es/download/tema/44/8035/731968456/122736/cms/tema-7-el-diagnostico-prenatal-mediante-array.pdf/>.
57. Del Campo M, Plaja A, Casals E, Figueras F, de la Chica R, Armengol L, et al. "Recomendaciones para el uso clínico del microarray genómico en diagnóstico prenatal". *Prog Obstet Ginecol* (Internet) [Internet]. 2015;58(10):470-3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pog.2015.05.003>.
58. Castells-Sarret N, Cueto-González AM, Borregan M, López-Grondona F, Miró R, Tizzano E, et al. "Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio". *An Pediatr (Barc)* [Internet]. 2018;89(1):3-11
59. Mori M de LÁ, Mansilla E, García-Santiago F, Vallespín E, Palomares M, Martín R, et al. "Diagnóstico prenatal y array-hibridación genómica comparada (CGH) (I). Gestaciones de elevado riesgo". *Diagn Prenat* [Internet]. 2012;23(2):34-48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.003>
60. Levy B, Wapner R. "Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil Steril*" [Internet]. 2018 [citado 15 de abril de 2024];109(2):201-12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.005>.
61. Práctica UG. "Genómica en Medicina" [Internet]. *Www.uv.es*. [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: [https://www.uv.es/varnau/GM\\_Cap%C3%ADtulo\\_2.pdf](https://www.uv.es/varnau/GM_Cap%C3%ADtulo_2.pdf).
62. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, Malashka A, Laccone F, Neesen J. "Optical genome mapping in routine human genetic diagnostics—its advantages and limitations". *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 [citado 15 de abril de 2024];12(12):1958. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/genes12121958>.
63. Mantere T, Neveling K, Pebrel-Richard C, Benoist M, van der Zande G, Kater-Baats E, et al. "Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection. *Am J Hum Genet*" [Internet]. 2021;108(8):1409-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.05.012>.
64. "Mapeo óptico genómico como herramienta de análisis citogenético" [Internet]. *Genotipia*. 2021 [citado 15 de abril de 2024]. Disponible en: [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/mapeo-optico-genomico/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/mapeo-optico-genomico/).
65. Sahajpal NS, Barseghyan H, Kolhe R, Hastie A, Chaubey A. "Optical genome mapping as a next-generation cytogenomic tool for detection of structural and copy number variations for prenatal genomic analyses". *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 [citado 15 de abril de 2024];12(3):398. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/genes12030398>.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

Primero quería agradecerle a mi tutora Elena su implicación y dedicación conmigo en la realización de este trabajo, sin ella no habría sido posible.

En segundo lugar, a mi familia, en especial a mis padres, hermanos y abuelos Isidro y Maribel, gracias a ellos estoy donde estoy y he llegado hasta aquí. Gracias por confiar en mí, gracias por darme la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera y sobre todo gracias por acompañarme en el camino, en los momentos buenos y en los no tan buenos. Espero que estéis orgullosos de mí, os quiero.

A mi abuela M<sup>º</sup> de la Luz y a mi abuelo Laudelino que en todo momento me han mandado fuerza desde el cielo, os tengo muy presentes.

Gracias a Charly porque prácticamente desde el día 1 estuvo ahí, apoyándome y ayudándome en todo lo que necesitaba, siempre has creído en mí y juntos hacemos el mejor equipo.

Gracias a mis amigos, en especial a Pablo, por empezar y acabar este camino juntos, es una suerte poder crecer a tu lado, estoy segura de que seremos unos grandes médicos.

Para terminar, quería dar las gracias a todas las personas que me han acompañado estos años, a las que están y a las que ya no, y a tantos profesores y médicos que me han inspirado en convertirme en una gran profesional y poder dedicar mi vida a ayudar a otros, creo que no hay nada más gratificante.