



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ABORDAJE DE NUEVOS DIAGNÓSTICOS
GENÉTICOS FETALES EN SANGRE
MATERNA**

Sara Perlado Marina

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ABORDAJE DE NUEVOS DIAGNÓSTICOS GENÉTICOS FETALES EN SANGRE MATERNA

Memoria presentada para optar al grado de doctora en Biología Molecular:

Sara Perlado Marina

Trabajo dirigido por:

Marta Rodríguez de Alba y Ana Bustamante Aragonés

En el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz

Madrid, 2016

A mis padres
A mi familia y amigos
A todos vosotros os dedico esta tesis

“Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil”

Marie Curie

(1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han formado parte de esta Tesis a nivel profesional y personal a lo largo de todos estos años y a las que van dedicadas estas líneas.

En primer lugar me gustaría agradecer esta Tesis a **Carmen Ramos**. Gracias por darme la oportunidad de entrar en el Laboratorio de Citogenética a realizar mi *Proyecto Fin de Carrera* donde comenzó mi formación y dedicación por la Genética. Por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. A nivel personal tengo que agradecerte tu humanidad, cercanía, cariño y apoyo durante todo este tiempo.

A **Carmen Ayuso** por abrirme las puertas del laboratorio, por tu capacidad divulgativa de todo lo que se hace en él, por compartir tus conocimientos y sabios consejos y por ofrecer oportunidades.

A mi tutora, **Antonia Fernández Peralta**. Por tutelar esta Tesis Doctoral. Por toda tu colaboración y amabilidad a lo largo de estos años.

A mis directoras de Tesis **Marta Rodríguez de Alba** y **Ana Bustamante Aragonés**.

A **Marta**, por enseñarme todo lo que sé de Citogenética, por abrir mi mente y hacerme ver que la citogenética y la molecular no son mundos diferentes, que lo “bonito” es complementarse. Gracias por ayudarme a mejorar y enseñarme a transmitir lo aprendido de la manera más adecuada.

A **Ana**, por haber compartido conmigo todos tus conocimientos que han hecho poder seguir con esta línea de investigación tan apasionante y gratificante. Por tu sabiduría y todos los consejos que me has dado, por haberme hecho pensar el “por qué” y profundizar en los resultados ya fueran positivos o no.

Gracias a las dos por dirigir esta Tesis Doctoral que ha permitido dar un pasito más en este campo.

A **Mariajo**, tanto a nivel profesional compartiendo todos tus conocimientos y enseñándome cosas nuevas, haciéndolo siempre con la mejor de tus sonrisas. Como a nivel personal, interesándote siempre por los demás. Muchas gracias por todo el cariño que me has dado.

A **Isa**, por tu apoyo incondicional, tu generosidad y tus consejos. Por preguntarme, preocuparte y ayudarme en todo. Gracias simplemente por ser como eres y haber tenido la suerte de compartir todo este tiempo contigo.

A **Rosa** y a **Miguel**, muchas gracias por vuestro apoyo y por ser como sois, pero sobre todo gracias por haberme dado siempre tantísimo cariño.

A **Camilo** y a **Jesús**, gracias por la infinidad de “risas con los colegas” que hemos tenido. Por supuesto que a nivel profesional me habéis enseñado muchísimas cosas y me habéis ayudado siempre que lo he necesitado pero sobre todo os agradezco los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio.

A **Fernando** y **Carolina**. A ti Fer, por estar ahí desde que entré al laboratorio, hace ya unos años. Por enseñarme muchas cosas de las que sé y por escucharme siempre que lo he necesitado. A Carol, aunque hemos coincidido poco tiempo te agradezco los ratos que hemos compartido.

A **Tere**, **Aurori** y **Cris**. Por todo el cariño que me habéis dado desde el principio.

A **Mónica** y a **Milena**. A Moni, por compartir todo conmigo, tus conocimientos en genética, tu experiencia y tu afán de superación. Gracias porque has sido un ejemplo a seguir y me has mostrado tu ayuda siempre. A Milena, porque los comienzos en la Fundación no hubieran sido los mismos sin toda tu ayuda y tu amistad. Muchas gracias a las dos.

A **Raquel** y a **Rocio**. Por todo lo que hemos disfrutado dentro y fuera del laboratorio juntas.

A **Roci** y a **Lauri**. Simplemente deciros que no concibo toda mi estancia en la Fundación sin vosotras, gracias por ser un apoyo total y absoluto todos estos años y por ser las amigas que sois.

A **Clara** y a **Nerea**. Teneros en el laboratorio ha sido una gran suerte pero seguir teniéndoos como amigas fuera de él es una suerte aún mayor. Gracias.

A **Valentina**. Gracias por tu alegría, tu entusiasmo, tus ganas de aprender pero sobre todo por tu saber disfrutar de la vida y de la gente que tienes a tu alrededor, es maravilloso tenerte como amiga.

A **Caro**. Creo que el primer día que te sentaste al microscopio ya hablamos, y que al día siguiente ya empezó nuestra amistad. Solo sé que a día de hoy si cabe esa amistad es aún mayor. Gracias por estar siempre ahí, en los buenos y no tan buenos momentos.

A **Martita**. Tengo mucho que agradecerte tanto dentro del laboratorio, compartiendo miles de momentos juntas, ayudándome a pensar, a escribir, a experimentar, como fuera del laboratorio, compartiendo risas, lloros, viajes y un largo etcétera, que me faltarían líneas. Sabes que tu contribución en esta Tesis es inmensa pero sobre todo sabes que el cariño que te tengo es muchísimo mayor.

A **todos los que formáis o habéis formado parte del laboratorio**, porque todos habéis contribuido a esta tesis, ojalá os pudiera poner a cada uno de manera individual pero no hay tanto espacio. Gracias a Iker, Patri, Fiona, Marta Cortón, Diego, Almu, Loli, Pilar, Sorina, Choni, María, Cris, Oliver, Ruth. También a todos los que estábais al otro lado del pasillo pero me habéis mostrado vuestro apoyo, a Laura y Jonay a Getzane, a Rosa a Susana. A Dani, por estar ahí desde que llegué. Muchas gracias a todos.

Al **Servicio de Ginecología y Obstetricia**, a Marisa por ayudarme con la recogida de muestras de las pacientes, a Javier Plaza y Joaquín Díaz Recasens porque sin la colaboración entre unos y otros no conseguiríamos seguir avanzando en las investigaciones. Pero sobre todo **a LAS PACIENTES**. A todas las gestantes que han participado en el estudio y por las que en definitiva merece la pena seguir investigando.

A la **Fundación Conchita Rábago** por concederme la Beca Predoctoral para poder realizar esta Tesis Doctoral.

A todo el **Laboratorio de Genética del Hospital Universitario de Donostia**. Por darme la oportunidad de seguir trabajando en este campo. Por haberme hecho sentir "*como en casa*" desde el principio, por enseñarme cosas nuevas y hacer de esta nueva etapa una experiencia muy gratificante.

A mis **amigas del Cole**. Un millón de gracias por llevar todos estos años compartiendo cosas juntas. Por compartir las alegrías, éxitos y buenos momentos y por apoyarme de manera incondicional en los difíciles. Sois las mejores.

A mis **amigas de la Uni**. Por seguir siéndolo después de la carrera. Por formar parte de mi vida y enseñarme que la verdadera amistad no es verse todos los días, es estar separados y que nada cambie.

A mi **cuadrilla vasca**. Por formar parte de manera especial en la última parte de esta Tesis, la parte más dura de la escritura. Por haber hecho de esta nueva etapa una experiencia inolvidable.

A toda mi familia, a mi tía Feli por apoyarme siempre en todo. Pero sobre todo, de manera muy especial tengo que agradecer esta tesis a **Mis Padres**. A mi padre, por haber compartido conmigo toda tu experiencia, transmitirme tu pasión por lo que haces, ayudarme como a una más de tus becarias, pero sobre todo tengo que agradecerte tu cariño, tu apoyo y tu comprensión en tu papel como padre. A mi madre, todo el apoyo, buenos consejos, tranquilidad en los momentos más complicados y sobre todo el inmenso cariño que me has dado. Gracias a los dos.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El Diagnóstico Prenatal No Invasivo se basa en el estudio de ADN fetal circulante en el torrente sanguíneo materno y permite obtener información genética del feto a partir de la extracción de sangre periférica de la gestante. El potencial de este diagnóstico es evitar los riesgos asociados a los métodos invasivos tradicionales de diagnóstico prenatal, tales como la amniocentesis o la biopsia corial. Actualmente ya se han incorporado en la rutina del seguimiento prenatal de una gestación, estudios no invasivos como: determinación del sexo fetal en gestaciones con riesgo de una enfermedad ligada al sexo, estudio del RhD fetal en gestantes Rh negativas, cribado de las aneuploidías más frecuentes y diagnóstico de enfermedades monogénicas de origen exclusivamente paterno o *de novo*.

A pesar de los grandes avances experimentados en el campo en los últimos años gracias a la incorporación de nuevas técnicas moleculares a partir de las cuales la sensibilidad y precisión se ha incrementado notablemente, el DPNI de enfermedades monogénicas de origen materno no está disponible aún en la rutina clínica. Esto es debido fundamentalmente a las peculiaridades que presenta la muestra de plasma materno tales como: la coexistencia de ADN materno y fetal, el bajo porcentaje de ADN fetal (9-20%) en la muestra y el carácter fragmentado de las secuencias fetales.

Esta tesis doctoral muestra el abordaje de nuevos estudios genéticos fetales en sangre periférica materna en gestaciones en las que el feto presenta riesgo de alguna enfermedad monogénica, con independencia del origen parental y del modelo de herencia. Esta nueva contribución al campo del DPNI ha sido de dos maneras: a) aumentando el espectro de mutaciones paternas estudiadas asociadas a enfermedades de herencia dominante y recesiva y, b) desarrollando un nuevo protocolo que permita el estudio de mutaciones fetales con independencia del origen parental, incluyendo las mutaciones fetales de herencia materna. Para ello se muestra la validación de una de las tecnologías de nueva generación recientemente incorporadas como es la PCR Digital, tras la cual se han podido abordar casos reales donde padre, madre o ambos progenitores son portadores de mutaciones asociadas a una determinada enfermedad monogénica.

Los resultados que se derivan de este trabajo ponen de manifiesto la posibilidad real de ofrecer un Diagnóstico Prenatal No Invasivo a aquellas gestantes en las que el feto presente riesgo de enfermedades de herencia monogénica donde los progenitores tienen caracterizados la mutación/es puntual/es asociada a la patología y poder así mejorar el manejo de estas gestaciones.

ABSTRACT

Non-Invasive Prenatal Diagnosis (NIPD) is based on the study of circulating cell free fetal DNA in the maternal bloodstream and it allows the genetic study of the fetus through the obtaining of a peripheral blood sample from the pregnant women. The potential is to avoid associated risks to the conventional invasive prenatal diagnosis, such as amniocentesis or chorionic villus sampling. At present, some non-invasive tests have been incorporated in clinical practice with the aim of helping in pregnancy management. Those tests are: fetal sex determination in pregnancies at risk of an X-linked disorder, RhD determination for negative RhD pregnant women, screening of the most common aneuploidies and the study of monogenic disorders exclusively paternally inherited or *de novo*.

Despite the advances in the last few years with the incorporation of new molecular techniques associated to high sensitivity rates, NIPD of maternally inherited monogenic disorders have not been yet incorporated in the routine clinical practice. This is due to the characteristics of the genetic material present in maternal plasma which are: coexistence of fetal and maternal DNA, the low percentage of fetal DNA (around 9-20 %) and the small fragmented fetal sequences in maternal plasma sample.

This Thesis is focused on the development of new fetal genetic studies in maternal blood in gestation where fetus is at risk of a monogenic disorder independently of the parental origin and the inheritance model. This work contributes to the NIPD field in two ways: a) increasing the spectrum of paternal mutations studied that are associated to dominant and recessive disorders, and b) developing a new protocol which allows the study of fetal mutations in maternal blood independently of the parental origin. To pursuit this second objective, this work includes the validation of one of the recent technologies incorporated to the molecular biology field, the Digital PCR. Once the validation was performed real cases where the mother, the father or both of them where carriers of different mutations associated to a specific monogenic disorder, were tested.

The results obtained in this work demonstrate that NIPD can be offered as a real option to those pregnant women where the fetus is at risk of a monogenic disorder and where paternal mutation are well characterized.

ÍNDICE

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

I.	DIAGNÓSTICO PRENATAL	1
1.	Pruebas en Diagnóstico Prenatal	2
	1.1 Pruebas Obstétricas No Invasivas	2
	1.2 Pruebas Obstétricas Invasivas	3
II.	DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO	4
1.	Células Fetales en sangre materna	5
2.	ADN fetal en sangre materna	5
	2.1 Descubrimiento del ADN fetal	5
	2.2 Origen y biología del ADN fetal	6
	2.3 Epigenética	7
3.	Aplicación clínica del DPNI	8
	3.1 Determinación del sexo fetal	9
	3.2 Diagnóstico del factor RhD	10
	3.3 Diagnóstico del antígeno KELL	10
	3.4 Cribado prenatal no invasivo	11
	3.5 Diagnóstico de enfermedades monogénicas	12
4.	Patologías estudiadas en el presente trabajo	14
	4.1 Enfermedades monogénicas dominantes	14
	4.1.1 Enfermedad de Huntington	14
	4.1.2 Epidermolisis Bullosa Distrófica	14
	4.1.3 Síndrome de Rendu Osler Weber	14
	4.1.4 Aniridia	15
	4.1.5 Miopatía NemaIínica	15
	4.1.6 Síndrome de Marfan	15
	4.1.7 Acondroplasia	16
	4.2 Enfermedades monogénicas recesivas	16
	4.2.1 Fibrosis Quística	16
	4.2.2 Mucopolisacaridosis tipo IIIB	16
	4.2.3 Hipoplasia de cartílago-pelo	17

	4.2.4 Síndrome de Bartter tipo III	17
	4.2.5 Síndrome de Ellis Van Creveld	17
	4.2.6 Epidermolisis Bullosa juntural tipo Herlitz	18
	4.2.7 Síndrome de Defecto de glicosilación 1A	18
	4.2.8 Síndrome de Disfunción múltiple mitocondrial	18
	4.3 Enfermedades ligadas al cromosoma X	19
	4.3.1 Retinosquisis	19
III.	APORTACIONES DEL PRESENTE TRABAJO AL DPNI DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS	19
OBJETIVOS		
I.	OBJETIVO GENERAL	21
II.	OBJETIVOS CONCRETOS	21
PACIENTES Y MÉTODOS		
I.	ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA	22
II.	PACIENTES	23
	1. Gestantes para el Diagnóstico de Enfermedades monogénicas	23
	1.1 Casos con abordaje de mutación paterna o <i>de novo</i>	23
	1.2 Casos con abordaje de mutación paterna y materna	29
	1.3 Casos con abordaje de mutación materna	30
	2. Gestantes para el estudio de validación de la PCR Digital	33
III.	MÉTODOS	34
	1. Recogida y procesamiento de muestras	34
	1.1 Muestras de plasma materno para estudio ADN fetal	34
	1.1.1 Recogida de muestras de sangre materna	34
	1.1.2 Procesamiento muestras de plasma materno	34
	1.2 Muestras de sangre periférica	35
	1.2.1 Sangre periférica de gestante	35
	1.2.2 Sangre periférica pareja de la gestante	35
	1.3 Muestras de Diagnóstico Prenatal convencional	35
	2. Extracción de ADN	36
	2.1 Extracción de ADN de plasma materno	36
	2.2 Extracción de ADN de sangre periférica	36

2.3 Extracción de ADN de muestras fetales	37
2.3.1 ADN de vellosidad corial	37
2.3.2 ADN de líquido amniótico	37
IV. TÉCNICAS DE ANÁLISIS	38
1. PCR Cuantitativa Fluorescente (QF-PCR)	38
1.1 Aplicada al estudio de mutaciones dinámicas	39
1.2 Aplicada al estudio de marcadores STR	40
2. PCR a Tiempo Real (RT-PCR)	42
2.1 Determinación de sexo fetal	42
2.2 Genotipado de SNPs en ADN genómico	43
3. Minisequenciación o SNaPshot	45
3.1 Estudio directo de mutaciones puntuales	45
3.2 Estudio de estimación de presencia ADN fetal	48
3.2.1 Estudio del gen <i>SRY</i>	48
3.2.2 Estudio de SNPs del cromosoma X	48
4. Tecnología de PCR Digital	49
4.1 Estudio de validación de la PCR Digital	51
4.2 Estudio de mutaciones fetales	51
4.3 Interpretación resultados ddPCR para DPNI	52
4.3.1 Detección de alelos paterno	52
4.3.2 Cuantificación de alelos maternos	53
4.4 Estudio de estimación de presencia de ADN fetal	55
4.4.1 Estudio multiplex genes <i>SRY/GAPDH</i>	55
4.4.2 Estudio multiplex genes <i>RASSF1A/GAPDH</i>	56

RESULTADOS

1. Resultados de DPNI de Enfermedades monogénicas	57
1.1 Resultados de DPNI con mutación paterna o <i>de novo</i>	57
1.2 Resultados de DPNI con mutación paterna y materna	73
1.3 Resultados de DPNI con mutación materna	78
2. Resultados del estudio de validación de la PCR Digital	81
2.1 Resultados de SNPs autosómicos	81
2.1.1 Detección alelos paternos y <i>de novo</i>	81
2.1.2 Cuantificación mediante cálculo de <i>Z-score</i>	82

2.2 Resultado de SNPs del cromosoma X	82
2.2.1 Casos feto hembra	82
2.2.2 Casos feto varón	83
2.3 Resultados estimación presencia ADN fetal	84
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	105
PUBLICACIONES	116

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACH	Acondroplasia
ACTA1	Alfa actina 1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFP	Alfa-Fetoproteína de origen fetal
AN	Aniridia
BARTSIII	Síndrome de Bartter tipo III
BC	Biopsia Corial
B-hCG	Beta Gonadotropina Coriónica humana
ccffDNA	<i>circulating cell free fetal DNA</i>
CDG-1A	Síndrome de defecto de glicosilación 1A
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i>
CHH	Hipoplasia de cartílago-pelo
CLCNKB	<i>Chloride channel Kb gene</i>
COL7A1	Cadena alfa 1 del colágeno tipo 7
COLD-PCR	<i>CO-Amplification at Lower Denaturation temperature-PCR</i>
dPCR	<i>Digital PCR</i>
ddPCR	<i>Droplet Digital PCR</i>
DDEB	Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
DP	Diagnóstico Prenatal
DPNI	Diagnóstico Prenatal No Invasivo
EBJ-H	Epidermosis Bullola Juntural tipo Herlitz
EH	Enfermedad de Huntington
EHRN	Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido
ENG	Endogлина
EVC	Ellis van Creveld
FBN1	Fibrilina 1
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
FQ	Fibrosis Quística
HTT	<i>Huntingtina</i>

IGF2-H19	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
ISPD	Sociedad Internacional de Diagnóstico Prenatal
LA	Líquido Amniótico
LAMC2	<i>Laminin subunit gamma 2</i>
MFS	Síndrome de Marfan
MMDS1	Síndrome de disfunción múltiple mitocondrial
MN	Miopatía Memalinica
MPS	<i>Massive Parallel Sequencing</i>
MPSIII	Mucopolisacaridosis IIIB
NAGLU	<i>N-acetyl-alpha-glucosaminidase</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NSGC	Sociedad Nacional de Consejo Genético
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAPP-A	Proteína Plasmática A asociada al embarazo
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMM2	<i>Phosphomannomutase 2</i>
QF-PCR	PCR cuantitativa fluorescente
RASSF1A	<i>Ras Association domain family protein 1 gene</i>
Rh	<i>Rhesus</i>
RHDO	<i>Relative Haplotype Dosage</i>
RMD	<i>Relative Mutación Dosage</i>
RMRP	<i>RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease</i>
RS1	<i>Retinoschisin 1</i>
RT-PCR	PCR a Tiempo Real
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
THH	Telangiectasia Hemorraagica Hereditaria
TN	Translucencia Nucal
VC	Vellosidad Corial
XLRS	Retinosquiasis ligada al X

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. DIAGNÓSTICO PRENATAL CONVENCIONAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el Diagnóstico Prenatal (DP) como toda aquella acción diagnóstica encaminada a identificar un *defecto congénito*, entendiendo por tal, *toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacimiento (aunque pueda manifestarse más tarde), externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no y única o múltiple*.

El interés sobre la salud fetal comenzó en los años 50 con la introducción de la amniocentesis por Bevis en 1952 para el diagnóstico de la eritroblastosis fetal. Los avances en las técnicas citogenéticas de años posteriores permitieron realizar los primeros cultivos de líquido amniótico (LA) lográndose, entre 1965 y 1966, los primeros cariotipos fetales a partir de amniocitos (Steele y Breg, 1966). Este hecho permitió el desarrollo de una herramienta muy valiosa para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas o cromosomopatías. Los descubrimientos y avances en el diagnóstico prenatal se fueron multiplicando en años sucesivos. En 1968 Nadler y Dancis realizaron, de forma independiente, los primeros diagnósticos de errores congénitos del metabolismo en células cultivadas de líquido amniótico. A finales de ese mismo año Brock y Sutcliffe confirmaron la utilidad de la alfa-fetoproteína para el diagnóstico de los defectos del tubo neural fetal.

La introducción de la ecografía bidimensional a partir de 1968 permitió, además del estudio del cariotipo fetal como se venía haciendo hasta el momento, el conocimiento de las características fenotípicas del feto. En un primer momento, los equipos desarrollados sólo permitían la identificación de un número limitado de anomalías, como la anencefalia (Horowitz y cols., 1969; Campbell y cols., 1972). El desarrollo en años posteriores de equipos más sofisticados, aumenta el número de malformaciones que se pueden detectar por esta técnica.

En 1983 se utilizaron por primera vez las vellosidades coriales para el diagnóstico de anomalías cromosómicas (Brambati y Simoni, 1983; Ramos y cols., 1984). Esta nueva técnica se presentó como una alternativa al cultivo de líquido amniótico, permitiendo el estudio cromosómico, molecular y bioquímico del feto en el primer trimestre de gestación.

En las dos últimas décadas la evolución del Diagnóstico Prenatal ha ido unida al avance de los métodos ecográficos y bioquímicos así como al desarrollo e incorporación de nuevas

técnicas genéticas moleculares de elevada sensibilidad y precisión, lo que ha permitido llevar a cabo diagnósticos cada vez más tempranos, fiables y menos invasivos.

1. Pruebas en Diagnóstico Prenatal

El diagnóstico prenatal convencional engloba un conjunto de pruebas obstétricas y bioquímicas que se pueden dividir en invasivas y no invasivas, según impliquen o no la invasión del medio intrauterino.

1.1 Pruebas Obstétricas No Invasivas

Las pruebas denominadas no invasivas dentro del DP no conllevan ningún riesgo para las gestantes y dan información importante del estado fetal a lo largo de los diferentes trimestres de gestación. Estas pruebas establecen una probabilidad de riesgo de que el feto tenga un defecto congénito y se realizan de manera rutinaria en el seguimiento del embarazo. En este grupo existen métodos que emplean ondas ultrasónicas (Ecografía) y pruebas bioquímicas efectuadas en sangre de la gestante (Cribado Bioquímico).

- ❖ **Ecografía:** La ecografía obstétrica consiste en la visualización del embrión o feto dentro del útero materno mediante ultrasonidos. Se trata de un método de diagnóstico morfológico imprescindible en el seguimiento del embarazo. Mediante esta técnica se detectan el 80% de los defectos congénitos con manifestación morfológica. También es una herramienta indispensable para la realización de las Pruebas Obstétricas Invasivas convencionales (*apartado 1.2*).

En el primer trimestre de gestación el marcador ecográfico más utilizado es la medición del pliegue o Translucencia Nucal (TN) que consiste en la medición ecográfica del grosor del acúmulo fisiológico de líquido en la nuca del feto. El grosor de la TN aumenta con la edad gestacional, por lo que la importancia de su grosor está en relación con la longitud del feto. Un pliegue nucal aumentado (>3 mm) puede asociarse a fetos con trisomía 21 u otras alteraciones cromosómicas.

- ❖ **Cribado Bioquímico:** La medida de determinados marcadores bioquímicos asociados a la gestación puede emplearse como un indicador del estado fetal ya que la

concentración de estos valores se encuentra alterada en gestaciones con fetos portadores de determinadas anomalías cromosómicas.

Según el trimestre de gestación en que se realiza el cribado bioquímico, se miden distintas proteínas, entre las que se encuentran: la B-hCG (beta gonadotropina coriónica humana total o su fracción libre); la PAPP-A (proteína plasmática A asociada al embarazo); la alfa-fetoproteína de origen fetal (AFP); el Estriol no conjugado (E3) (origen fetoplacentario) o la Inhibina A (origen placentario citotrofoblasto).

La evaluación conjunta de los niveles hormonales (PAPP-A y B-hCG) junto con la edad materna (marcadores epidemiológicos) y la medida del pliegue nucal del feto (marcadores ecográficos) es lo que se denomina cribado combinado del primer trimestre, y es el más utilizado actualmente para dar la probabilidad de riesgo de que el feto tenga Síndrome de Down (trisomía 21) o Síndrome de Edwards (trisomía 18).

Ante el hallazgo de parámetros alterados en dichas pruebas no invasivas que incrementen la posibilidad de tener un hijo con defectos congénitos, existe la opción de realizar un Diagnóstico Prenatal Invasivo.

1.2 Pruebas Obstétricas Invasivas

Este segundo grupo de pruebas están enfocadas a la población considerada en riesgo (*Figura 1*). Se realizan con el fin de obtener tejido fetal para realizar el diagnóstico citogenético y/o molecular prenatal. La principal desventaja de estas técnicas es el riesgo de pérdida fetal que se cifra, según las últimas estimaciones, entre el 0,5-1% (Akolekar y cols., 2015; Wulff y cols., 2016). Además, desde un punto de vista psicológico, la realización de estas pruebas genera gran ansiedad y estrés en la gestante.

Indicaciones para la realización de un Diagnóstico Prenatal Invasivo

- ✓ Índice de riesgo del cribado combinado del primer trimestre elevado
- ✓ Historia familiar de enfermedad genética heredada y diagnosticable
- ✓ Antecedentes de alteraciones cromosómicas
- ✓ Alteraciones ecográficas
- ✓ Confirmación de un Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP)

Figura 1. Indicaciones para la realización de un Diagnóstico Prenatal invasivo.

Las técnicas obstétricas invasivas más empleadas son:

- ❖ **Biopsia Corial (BC):** prueba en la que se recoge una muestra de vellosidad corial. Se realiza mayoritariamente entre las 11 y 13 semanas de gestación, mayoritariamente vía transcervical (*Figura 2a*). Para la realización de estudios moleculares la biopsia corial es la prueba preferente debido a que es la más precoz y en la que se recoge mayor cantidad de tejido fetal para la posterior extracción de ADN.
- ❖ **Amniocentesis:** mediante una punción abdominal se obtiene una muestra de líquido amniótico de la cavidad amniótica. Se realiza en el segundo trimestre de gestación, principalmente entre las semanas 15 y 20 del embarazo. Tiene un riesgo de pérdida fetal algo menor que el asociado a la biopsia corial (*Figura 2b*).

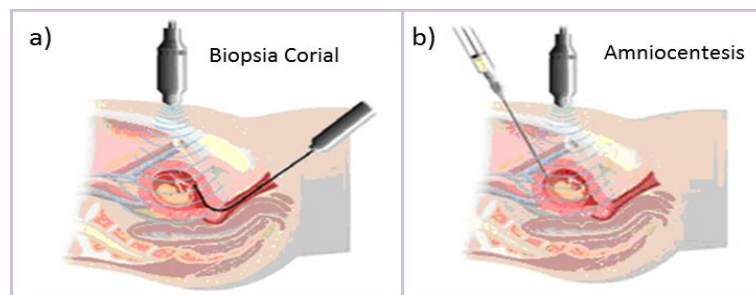


Figura 2. Técnicas obstétricas invasivas. 2a) Biopsia corial; 2b) Amniocentesis.

Otra técnica menos utilizada es la cordocentesis o funiculocentesis, que consiste en la recogida de sangre fetal a través del cordón umbilical. Se realiza en periodos avanzados de la gestación, a partir de la semana 20 y conlleva un riesgo de pérdida fetal mayor que las anteriores comprendido entre el 2 y 4%.

Debido al riesgo de pérdida fetal previamente mencionado, asociado a la realización de estas Pruebas Obstétricas invasivas, la tendencia dentro del campo del diagnóstico prenatal está enfocada a la búsqueda de diagnósticos precoces y menos invasivos. Con esta finalidad surgió el campo del Diagnóstico Prenatal No Invasivo (DPNI).

II. DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO

El Diagnóstico Prenatal No Invasivo consiste en el estudio de células/ADN fetal circulante en el torrente sanguíneo materno. Permite obtener información genética del feto

simplemente mediante la extracción de sangre periférica de la gestante y solventar de esta manera los riesgos de los métodos invasivos tradicionales.

1. Células fetales en sangre materna

En 1893, el patólogo alemán Schmörl (Schmörl y cols., 1893) describió por primera vez la presencia de células trofoblásticas en los pulmones y circulación sanguínea de gestantes fallecidas por eclampsia. Este hallazgo fue confirmado en 1959 por Douglas y cols y fue 25 años más tarde cuando se publicó el aislamiento de trofoblastos en sangre periférica materna (Covone y cols., 1984).

Tras numerosos estudios, en 1990 Bianchi y cols aislaron eritroblastos fetales en sangre materna mediante anticuerpos monoclonales que reconocían el receptor de la transferrina (CD71). A partir de este momento, muchos grupos de trabajo se centraron en el estudio de estas células como fuente de tejido fetal. El eritroblasto poseía características tales como una identificación morfológica sencilla además de ser una célula nucleada y por tanto contenía toda la información genética del feto, que lo convertían en el candidato ideal para el diagnóstico prenatal no invasivo.

Sin embargo, ante la escasez de células fetales en sangre materna, la dificultad de aislamiento y el laborioso proceso de análisis, estos estudios se relegaron a un segundo plano tras el descubrimiento del ADN fetal libre circulante en sangre materna.

2. ADN fetal en sangre materna

2.1 Descubrimiento del ADN fetal

En el año 1997, Lo y cols descubrieron la presencia de ADN fetal libre en el plasma materno. Este hecho surgió al relacionar los estudios que se habían realizado en pacientes con cáncer donde se había descubierto la presencia de ADN tumoral, circulante en el torrente sanguíneo (Leon y cols., 1977). De tal manera que dada la gran similitud, como elemento invasivo, entre un tumor y el tejido placentario (Strickland y cols., 1992), el grupo de Lo y cols, demostró que en el torrente sanguíneo materno existía ADN fetal libre circulante (*del inglés circulating-cell-free-fetal DNA, cffDNA*). La demostración de la existencia del ADN fetal se basó en la detección de secuencias del cromosoma Y en sangre de gestantes con feto varón, de tal manera que su presencia solo podría estar justificada por su origen fetal (Lo y cols., 1998).

Sin duda, este hecho fue el que dio un impulso fuerte al campo del DPNI. Así se abrió un nuevo campo de investigación aplicada que generaba enormes expectativas acerca de la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales a partir de sangre periférica materna y sin necesidad de utilizar ninguna de las técnicas obstétricas invasivas descritas anteriormente, para la obtención de material genético fetal.

2.2 Origen y Biología del ADN fetal en sangre materna

El origen tisular del ADN fetal, así como el mecanismo por el cual pasa al torrente sanguíneo materno han sido objeto de varios estudios. A día de hoy se considera que la mayor parte del ADN fetal presente en sangre materna procede de la apoptosis de células trofoblásticas de la placenta (Alberry y cols., 2007), hecho que explicaría: 1) el aumento de la cantidad de ADN fetal circulante en sangre periférica materna a medida que avanza la gestación (Wang y cols., 2013); 2) su rápida desaparición poco después del parto (Lo y cols., 1999; Smid y cols., 2003; Hui y cols., 2008) y 3) que este ADN se encuentre fragmentado, consecuencia de ser liberado por la apoptosis de estas células placentarias. Además, estos fragmentos de ADN son de menor tamaño que los de origen materno (Chan y cols., 2004; Kimura y cols., 2011); teniendo la mayoría de ellos una longitud media de 147 pares de bases (pb) (Yu y cols., 2014; Straver y cols., 2016).

Estudios realizados en mujeres embarazadas con técnicas de reproducción asistida revelaron que el ADN fetal se detectaba 28 días después de la transferencia (Guibert y cols., 2003). Otros estudios han detectado la presencia de este ADN a las 5 semanas de gestación (Birch y cols., 2005). En relación a la cantidad de ADN fetal presente en el plasma de gestantes, inicialmente se estimó que representaba, entre un 3-6% (Lo y cols., 1998). Sin embargo estudios más recientes, basados en resultados obtenidos con tecnologías más sensibles, han cifrado que entre el 9-20% de ADN circulante en sangre materna tiene un origen fetal (Lun y cols., 2008a). Finalmente, otra característica clave que ha condicionado los estudios no invasivos es la coexistencia del ADN materno y fetal en la muestra de plasma materno y la incapacidad actual de separarlos.

En este cuadro se resumen las características esenciales que definen el ADN fetal libre circulante en sangre periférica materna (*Figura 3*).

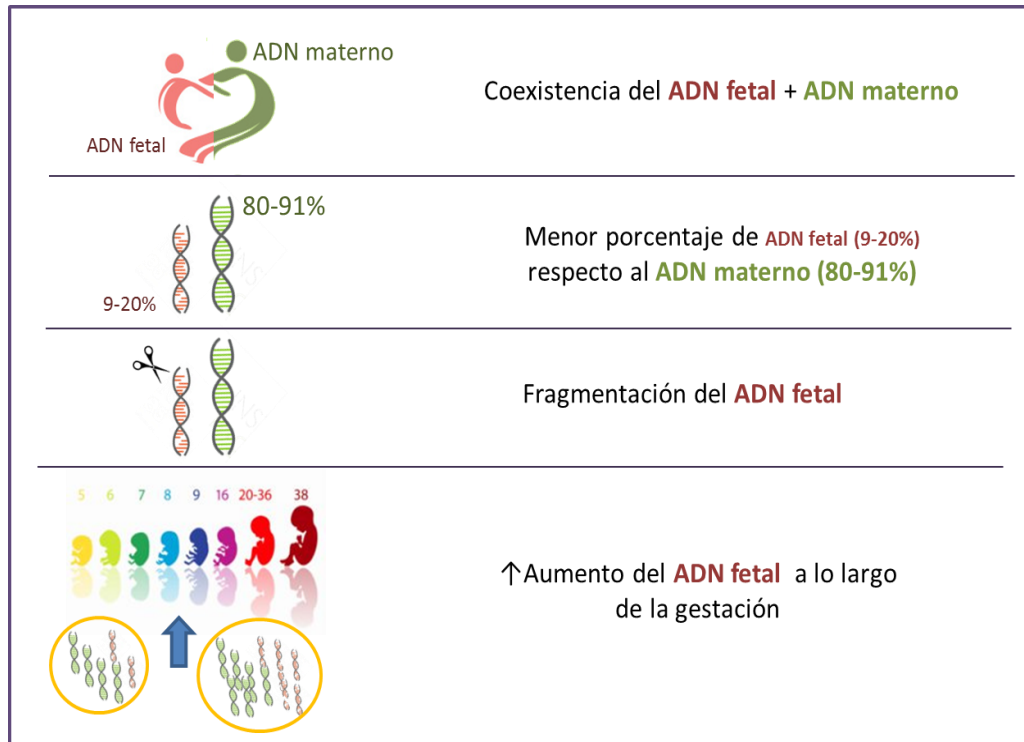


Figura 3. Características esenciales del ADN fetal circulante en sangre materna.

2.3 Epigenética

Ante la coexistencia del ADN fetal y materno en la muestra de plasma materno y la incapacidad de separarlos, se buscaron métodos que permitieran detectar de manera específica el ADN fetal. El uso de la impronta genómica como método que permitiera detectar de manera específica el ADN fetal con esta finalidad, fue descrita por primera vez por el grupo de Poon y cols, que documentaron diferencias en el estado de metilación entre secuencias fetales y maternas en una región del locus *IGF2-H19* humana (factor de crecimiento insulínico tipo 2) (Poon y cols., 2002). Más tarde, y basándose en las diferencias de metilación en tejidos de origen placentario, otros autores estudiaron el gen *Maspin (SERPINB5)*, gen supresor de tumores expresado en placenta. Este gen está hipometilado en la placenta y casi completamente metilado en las células sanguíneas maternas, por ello estos autores describían la detección de secuencias hipometiladas de dicho gen y por tanto de origen fetal en plasma materno (Chim y cols; 2005). Sin embargo, el estudio de regiones hipometiladas implica un protocolo de preparación previo del ADN que lo convierte en una técnica muy laboriosa.

Por ello en la actualidad estos estudios se han centrado en marcadores fetales epigenéticos que se encuentren hipermetilados frente al ADN materno. Con este objetivo

muchos de los trabajos se han centrado en otro de los genes en los que se ha descrito una diferencia de metilación entre feto y madre que es el gen *RASSF1A* (Chiu y cols., 2007; White y cols., 2012). Este gen está hipometilado en sangre materna e hipermetilado en ADN fetal, de tal manera que esta diferencia en el patrón de metilación, junto con el uso de enzimas de restricción sensibles a metilación, tales como la enzima *BSTU1*, permite la digestión de secuencias hipometiladas (ADN materno), dejando intactas las secuencias específicas hipermetiladas del feto (Chan y cols., 2006; Chiu y cols., 2007; Sifakis y cols., 2009; Bellido y cols., 2010; Papantoniou y cols., 2013) (Figura 4).

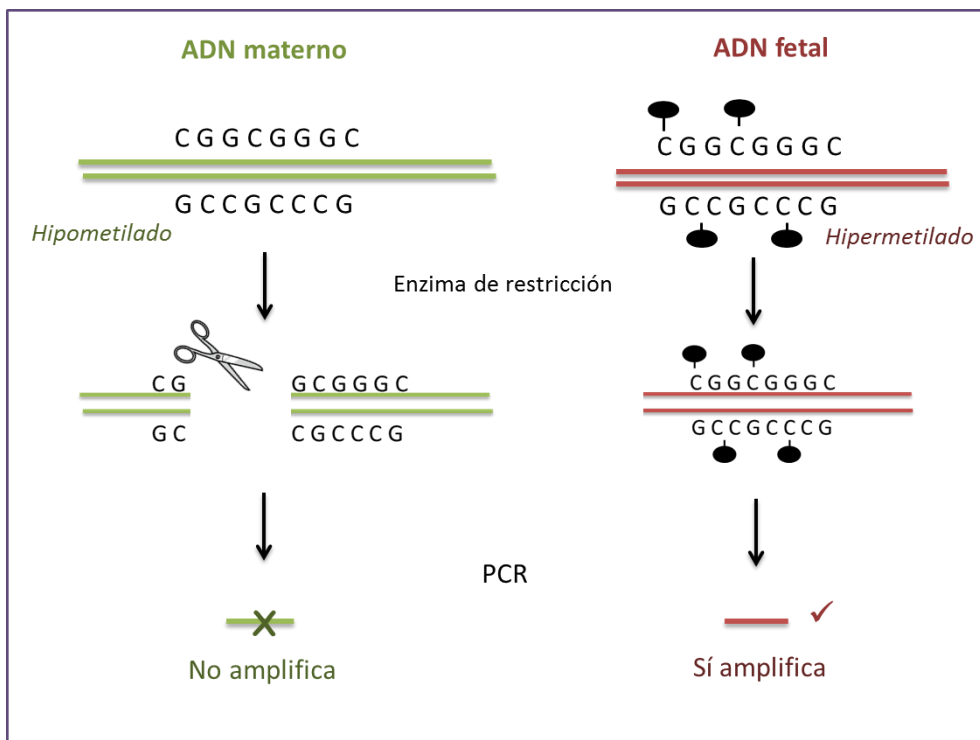


Figura 4. Utilidad de la variación genética entre madre y feto, en relación con el estado de metilación del ADN.

En el presente trabajo se describe la confirmación de presencia de ADN fetal en la muestra de ADN extraído de plasma materno a partir del estudio del gen *RASSF1A*.

3. Aplicación clínica del DPNI

Una de las principales limitaciones para la incorporación definitiva del DPNI en la rutina clínica ha sido la coexistencia de ADN fetal y materno en el plasma de la madre. Por ello, son limitados los diagnósticos que actualmente se han incorporado a la rutina clínica en el campo del DPNI.

3.1 Determinación de Sexo Fetal

El primer diagnóstico derivado del descubrimiento de la presencia de ADN fetal en sangre materna fue la determinación del sexo fetal, basado en la presencia/ausencia de secuencias del cromosoma Y, que se asocian a un feto varón/hembra respectivamente. El conocimiento del sexo fetal en estadios tempranos de la gestación es un dato relevante en el manejo de embarazos con riesgo de alguna enfermedad ligada al sexo como son, entre otras, la Distrofia Muscular de Duchenne, Hemofilia, Distrofia Muscular de Becker, Hiperplasia Adrenal Congénita, Enfermedad de Norrie, Retinosquisis o Retinosis Pigmentaria ligada al X.

La incorporación de la determinación del sexo fetal en el manejo de gestaciones con riesgo para estas patologías, ha relegado la necesidad de un Diagnóstico Prenatal convencional en aquellos casos en los que se descarte el sexo asociado a la enfermedad. Mediante esta prueba se evita el diagnóstico prenatal convencional en aproximadamente el 50% de las gestaciones, lo que implica la supresión del riesgo de pérdida fetal asociado a las técnicas obstétricas invasivas (Rodríguez de Alba y cols., 2012) (Figura 5).

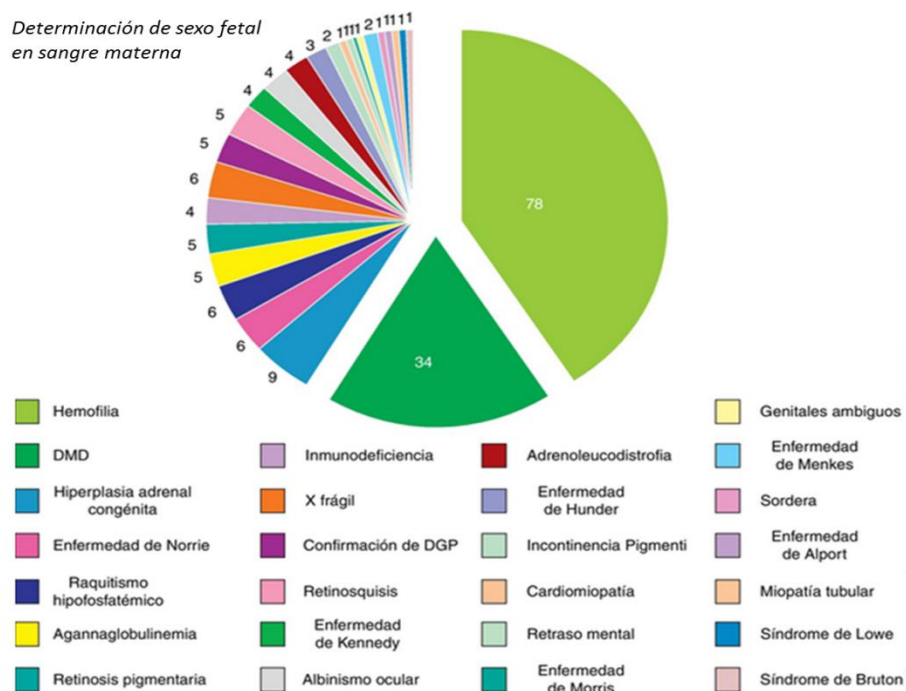


Figura 5. Imagen tomada del artículo (Rodríguez de Alba y cols., 2012). Representación de las enfermedades ligadas al sexo, susceptibles de ser abordadas mediante Determinación de Sexo Fetal en sangre materna.

La especificidad y sensibilidad de este test posee valores cercanos al 100% desde semanas tempranas del embarazo (semana 7-8 de gestación) según recoge un meta-análisis

publicado por Wright y cols donde se revisan datos de 90 publicaciones recogiendo casi un total de 9965 embarazadas (Wright y cols., 2012).

3.2 Diagnóstico del Factor RhD

Otro test, que se ha incorporado a la rutina clínica es el diagnóstico del factor RhD fetal en gestantes Rh negativas, Rh (-) (Legler y cols., 2009; Wikman y cols., 2012; Chitty y cols., 2014). La inclusión de esta prueba en el manejo de los embarazos de gestantes Rh negativas permite la supresión del tratamiento de inmunoprofilaxis en aquellas gestaciones en las que se diagnostica al feto como Rh (-) y en las que, por tanto, ya no existe riesgo de desarrollar la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).

El protocolo de análisis incluye la amplificación de los exones 5, 7 y, ocasionalmente, exón 10 del gen RhD. Se utiliza la combinación de estos exones por la posibilidad que ofrecen de detectar algunas de las variantes Rh existentes en población caucásica (Finning y cols., 2002; Gautier y cols., 2005) (Figura 6).

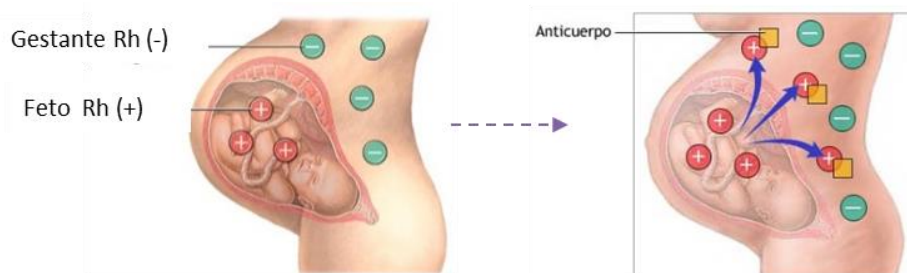


Figura 6. Representación de gestante Rh (-) y feto Rh (+) el cual porta el antígeno D, que son reconocidos como no propios por el sistema inmune materno, llevando a cabo una respuesta inmune primaria sobre ellos.

3.3 Diagnóstico del Antígeno Kell

El grupo sanguíneo Kell está formado por 24 antígenos, de los que destacan por su mayor inmunogenicidad y frecuencia el antígeno K (Kell1 o K1) y el k (Kell2, K2 o Cellano). El 91% de la población de origen caucásico son negativos para el antígeno K (kk) (Westhoff y cols., 2004). Los individuos Kell positivos son los que tienen el antígeno K en homocigosis (KK) o heterocigosis (Kk), siendo la mayoría de ellos heterocigotos (8,6%) (Moise y cols., 2000). La isoimmunización antikell se produce cuando una persona que carece del antígeno K, entra en contacto con el antígeno como ocurre en la isoimmunización eritrocitaria feto-materna.

La anemia fetal generada por esta isoimmunización tiene un origen fisiopatológico similar al anti-D, pero al que se suma en el primer trimestre la supresión de la eritropoyesis fetal. El antígeno Kell presenta una inmunogenicidad mucho menor que el antígeno responsable de la isoimmunización Rh, lo que explica que sólo el 5% de las personas Kell negativas sometidas a transfusión incompatible desarrollen respuesta inmune con formación de anticuerpos (Vaughan y cols., 1998; Babinszki y cols., 1998).

Cuando el padre es heterocigoto para el antígeno Kell (Kk), es importante conocer precozmente el grupo fetal, pues en los casos de feto Kell positivo la isoimmunización podrá ser grave. En la gran mayoría de los casos (aproximadamente un 80%) existe historia previa de transfusiones sanguíneas y/o abortos (Wenk y cols., 1985). Aunque con menor frecuencia también pueden sensibilizarse las madres con partos normales anteriores. Si se llega a un diagnóstico de isoimmunización anti-Kell la vigilancia fetal debe estrecharse recurriendo si es preciso a la transfusión intraútero. La posibilidad de determinar el genotipo en ADN fetal en sangre materna, en los casos con progenitor heterocigoto, se realiza a comienzos del segundo trimestre de forma no invasiva y eficaz y nos permite obtener una información muy valiosa de cara al tratamiento y evolución del feto.

3.4 Cribado Prenatal No Invasivo

En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing, NGS*) han permitido la incorporación a la práctica clínica del test de cribado prenatal no invasivo, estudiando el ADN fetal en sangre materna para el abordaje de los cromosomas responsables de las trisomías más frecuentes: trisomía 21 (Síndrome de Down), trisomía 18 (Síndrome de Edwards) y trisomía 13 (Síndrome de Patau), así como también de los cromosomas sexuales, e incluso en algunos casos incluyendo el estudio de los síndromes de microdelección más frecuentes: 22q11.2 (Síndrome de Di George), 1p36, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader Willy y del Síndrome del Maullido de Gato.

Se han publicado muchos estudios en estos años que analizan el rendimiento del cribado de aneuploidias en población de alto riesgo (Fan y cols., 2008; Chiu y cols., 2010; Palomaki y cols., 2011; Chiu y cols., 2011; Ehrich y cols., 2011; Palomaki y cols., 2012; Bianchi y cols., 2012; Norton y cols., 2012; Sparks y cols., 2012). En todos ellos se establece que desde las 10 semanas de gestación se puede detectar con alta fiabilidad la trisomía 21 en embarazos únicos en poblaciones de alto riesgo con elevada sensibilidad y especificidad.

Diversas entidades internacionales, entre las que se encuentra la Sociedad Internacional de Diagnóstico Prenatal (ISPD) y la Sociedad Nacional de Consejo Genético de Estados Unidos (NSGC), sustentan que esta prueba no es diagnóstica, y aunque constituye probablemente el test de cribado más exacto que existe, no sustituye al cariotipo fetal (Yagek y cols., 2013).

3.5 Diagnóstico de Enfermedades Monogénicas

Además de estas aplicaciones, ya incorporadas en la rutina clínica, el DPNI tiene el potencial de abordar otras patologías de origen genético como son las enfermedades monogénicas. Mediante el análisis de ADN fetal presente en sangre materna se han estudiado, hasta el momento, diversas enfermedades de herencia mendeliana empleando diferentes técnicas de análisis tales como PCR a Tiempo Real (Tungwiwat y cols., 2006), técnica de minisequenciación, PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) (Bustamante-Aragón et al., 2012), o COLD-PCR (*del inglés CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR*) (Galbiati y cols., 2016) entre otras.

Hasta la incorporación de nuevas tecnologías, sólo era posible estudiar defectos congénitos de herencia paterna o *de novo* debido a la imposibilidad actual de separar el ADN materno del ADN fetal. No obstante, y a pesar de esta limitación, se trata de un diagnóstico que no debe ser subestimado ya que permite mejorar el manejo de las gestaciones en las que hay un riesgo de transmisión de una enfermedad genética. De esta manera, en base a un criterio de presencia/ausencia de la mutación paterna en plasma materno han podido estudiarse patologías tales como Enfermedad de Huntington (González-González y cols., 2008; Van der Oever y cols., 2015), Acondroplasia (Lim y cols., 2011; Chitty y cols., 2011), Fibrosis Quística (González-González y cols., 2002; Nasis y cols., 2004), Distrofia Miotónica (Amicucci y cols., 2000); Amaurosis Congénita de Leber (Bustamante-Aragón y cols., 2008); Beta-talasemia (Tungwiwat y cols., 2006) o Craneosinostosis (Galbiati y cols., 2014).

Recientemente con la aparición de tecnologías de nueva generación tales como la Secuenciación Masiva o la PCR Digital el estudio de estas enfermedades ha sufrido un fuerte impulso. Han permitido la incorporación de nuevos estudios en la práctica clínica en Reino Unido, para el estudio de mutaciones asociadas a displasias tanatofóricas y fibrosis quística (Chitty y cols., 2015; Hill y cols., 2015). Pero sobre todo han supuesto un gran avance

permitiendo el abordaje de DPNI para el estudio de mutaciones de herencia materna (Gu y cols., 2014, Parks y cols., 2016).

El abordaje a seguir en este segundo grupo, donde la gestante es portadora de una mutación asociada a una determinada enfermedad monogénica, no sigue un criterio de presencia/ausencia de la mutación, sino que consiste en la determinación de un equilibrio/desequilibrio entre alelo mutado vs alelo normal resultado de la contribución fetal alélica en plasma materno. Este concepto se define como Dosis Relativa de Mutación (*del inglés Relative Mutation Dosage, RMD*) (Lun y cols., 2008b) (Figura 7). En caso de determinación de desequilibrio alélico entre haplotipos se denomina (*del inglés Relative Haplotype Dosage, RHDO*) (Lo y cols., 2010; Parks y cols., 2016), permitiendo en última instancia el genotipado fetal en plasma materno con independencia del origen fetal y del tipo de herencia.

De esta manera han podido abordarse patologías tales como Hiperplasia Adrenal Congénita (Khattab y cols., 2016), Fibrosis Quística (Debrand y cols., 2015; Zeevi y cols., 2015), Acidemia Metilmalónica (Gu y cols., 2014) o Distrofia Muscular de Duchenne y Distrofia Muscular de Becker (Parks y cols., 2016).

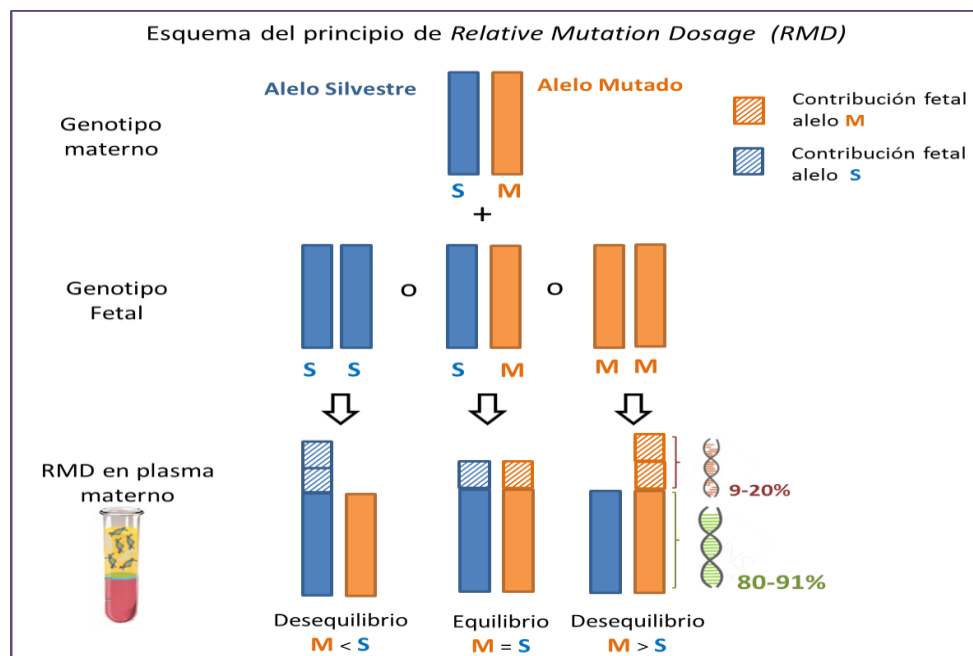


Figura 7. Ilustración esquemática de los principios de RMD. Cuando la gestante y el feto son ambos heterocigotos para una mutación genética, las cantidades del alelo mutante (M) y del alelo silvestre (S) es decir, la dosis alélica en plasma materno, estará en equilibrio. Cuando la madre es heterocigota y el feto es homocigoto para el alelo mutante o para el alelo silvestre, se observará una sobrerrepresentación del alelo fetal asociado. (Imagen modificada del artículo del grupo de Lun y cols; 2008b).

4. Patologías estudiadas en el presente trabajo

4.1 Enfermedades Monogénicas Dominantes

4.1.1 Enfermedad de Huntington

La Enfermedad de Huntington (EH; OMIM #143100) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por movimientos coreicos involuntarios, trastornos conductuales y psiquiátricos, y demencia. Se estima que la prevalencia en la población caucásica es de 1/10.000-1/20.000. La EH está causada por una expansión de repeticiones del triplete CAG, en el gen huntingtina, *HTT*, que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). En condiciones normales, el número de repeticiones de este triplete es de 27 o menos y constituye un polimorfismo estable del ADN. Los alelos intermedios (entre 27 y 35 repeticiones CAG) no causan patología; sin embargo, son inestables a la hora de transmitirse y pueden expandirse a una mutación en el rango patológico en la siguiente generación. Entre 36 y 39 repeticiones se consideran asociadas a la enfermedad pero con penetrancia incompleta y finalmente las repeticiones de 40 o más CAG se consideran patológicas (Walker y cols., 2007).

4.1.2 Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante

Las Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante (DDEB; OMIM #131750), es el subtipo de Epidermolisis Bullosa más frecuente que se caracteriza por la formación de ampollas generalizadas. Su prevalencia varía entre poblaciones desde 1/68.493 habitantes en Escocia a 1/1.010.000 en los Estados Unidos. El cuadro clínico es más leve que en las formas de Epidermolisis Bullosa generalizada autosómica recesiva. Suele manifestarse al nacimiento con el desarrollo de ampollas, que afectan principalmente a las extremidades. Esta enfermedad está causada por mutaciones en el gen del colágeno tipo VII (*COL7A1*) que conlleva una alteración en la función o una reducción en la cantidad de colágeno VII. Esto altera el ensamblaje del colágeno VII en fibrillas de anclaje que mantienen la membrana basal unida a la dermis subyacente.

4.1.3 Síndrome de Rendu Osler Weber

La enfermedad de Rendu-Osler-Weber, también llamada telangiectasia hemorrágica hereditaria (THH; OMIM #187300), es un trastorno de la angiogénesis que conduce a

dilataciones arteriovenosas: telangiectasias cutáneo-mucosas hemorrágicas y cortocircuitos viscerales. Su prevalencia varía entre 1/5.000 y 1/8.000. La enfermedad tiene un origen genético y está provocada por mutaciones en dos genes principalmente: *ACVRL1* y *ENG*, implicados en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta).

4.1.4 Aniridia

La aniridia (AN; OMIM #106210) es una malformación ocular congénita caracterizada por la ausencia parcial o completa del iris que puede ser aislada o parte de un síndrome (aniridia aislada y sindrómica). La incidencia anual de la aniridia aislada se estima en 1/64.000-1/96.000. La aniridia es debida, en la mayoría de los casos, a mutaciones en el gen *PAX6* (11p13) que codifica un regulador transcripcional implicado en la oculoagénesis. Las mutaciones en *PAX6* dan lugar a alteraciones en la expresión de la citoqueratina corneal, la adhesión celular y la expresión glicoconjugada.

4.1.5 Miopatía Nematínica

La miopatía nematínica (MN; OMIM #161800) abarca un amplio espectro de miopatías congénitas caracterizadas por hipotonía, debilidad y reflejos tendinosos profundos deprimidos o ausentes. Su incidencia anual se ha estimado en 1/50.000 nacidos vivos en un estudio finlandés, aunque es más común en la comunidad Amish. Se han vinculado con la miopatía nematínica 7 genes implicados en la estructura y función de los filamentos delgados del músculo: *NEB* (2q22), *TPM2* (9p13), *TPM3* (1q21.2), *ACTA1* (1q42.13), *TNNT1* (19q13.4), *CFL2* (14q12) y *KBTBD13* (15q22.31). No se ha establecido una correlación clara genotipo/fenotipo.

4.1.6 Síndrome de Marfan

El Síndrome de Marfan (MFS; OMIM #154700) es una enfermedad sistémica del tejido conectivo, caracterizada por una combinación variable de manifestaciones cardiovasculares, músculo-esqueléticas, oftalmológicas y pulmonares. La prevalencia se estima en 1/5.000 y afecta por igual a hombres y mujeres. En la inmensa mayoría de los casos, el Síndrome de Marfan se debe a mutaciones en el gen *FBN1*, localizado en el cromosoma 15 (15q21), el cual codifica para la fibrilina-1, una proteína esencial del tejido conectivo.

4.1.7 Acondroplasia

La Acondroplasia (ACH; OMIM #100800) es la forma más común de condrodisplasia. Se caracteriza por rizomelia, lordosis lumbar exagerada, braquidactilia y macrocefalia. A nivel mundial se calcula una incidencia de alrededor de 1/25.000 nacidos vivos. La ACH se debe a mutaciones en el gen receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR3*), que codifica un receptor transmembrana, importante en la regulación del crecimiento óseo, entre otras funciones. El diagnóstico prenatal puede producirse accidentalmente durante una ecografía prenatal rutinaria en el tercer trimestre. La mutación más frecuente en el gen *FGFR3*, que explica el 98% de los casos de Acondroplasia, es el cambio c.1138 G>A. El 80% de los casos, se debe a una mutación *de novo*.

4.2 Enfermedades Monogénicas Recesivas

4.2.1 Fibrosis Quística

La Fibrosis Quística (FQ; OMIM #219700) es un trastorno genético caracterizado por la producción de sudor con un alto contenido en sales y de secreciones mucosas con una viscosidad anormal. La incidencia es variable siendo menos frecuente en las poblaciones asiáticas y africanas que en las europeas y norteamericanas, con variación dentro de cada país. Se desconoce la prevalencia exacta en Europa, pero se estima que se sitúa entre 1/8.000 y 1/10.000 individuos. Es una enfermedad crónica y generalmente progresiva. La FQ es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR* localizado en el cromosoma 7. Aunque se han identificado más de 2000 mutaciones, la mutación más común que representa aproximadamente el 70% de todas las mutaciones encontradas en Estados Unidos es la delta F508, mientras que otras 30 mutaciones explicarían otro 20% más. No hay una correlación clara entre el genotipo y el fenotipo.

4.2.2 Mucopolisacaridosis tipo IIIB

La Mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPSIIIB; OMIM #252920) o Síndrome de Sanfilippo, es una enfermedad de almacenamiento lisosomal perteneciente al grupo de las mucopolisacaridosis. Existe un déficit de cuatro enzimas requeridas para la degradación del heparán sulfato, siendo las responsables de los distintos subtipos de MPS III: la heparán sulfamidasa en la MPS IIIA, la alfa-N-acetilglucosaminidasa para la MPS IIIB, la alfa-

glucosaminida N-acetiltransferasa, para la MPS IIIC, y la N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa para la MPS IIID. La prevalencia es difícil de establecer, está en torno al 1 de cada 24.000 nacimientos (Países Bajos) o 1 de cada 120.000 (Australia) para el tipo IIIA, las frecuencias son mucho menores para los tipos IIID y IIIC (por debajo de 1/1.000.000). Los cuatro genes codificantes de estas enzimas han sido localizados (MPS IIIA en 17q25, MPS IIIB en 17q21, MPS IIIC el región pericentromérica del cromosoma 8 y MPS IIID en 12q14).

4.2.3 Hipoplasia de cartílago-pelo

La hipoplasia de cartílago-pelo (CHH; OMIM #250250) o condrodisplasia metafisaria tipo McKusick, es una enfermedad que afecta a la metafisis de los huesos causando baja estatura desde el nacimiento. La prevalencia es desconocida. La enfermedad está asociada con cabello fino, de crecimiento lento, y a veces con deficiencias del sistema inmunitario. Las mutaciones en el gen *RMRP* (componente de ARN de la endoribonucleasa procesadora del ARN mitocondrial), que está localizado en el locus 9p21-p12, son las responsables de la enfermedad.

4.2.4 Síndrome de Bartter tipo III

El síndrome de Bartter tipo III (BARTSIII; OMIM #607364) se caracteriza por la asociación de alcalosis hipopotasémica, niveles plasmáticos elevados de renina y aldosterona en plasma, presión arterial baja y resistencia vascular a la angiotensina II. La incidencia anual se estima en 1/830.000 individuos. Está causado por mutaciones en homocigosis o en heterocigosis compuesta en cuatro genes que codifican proteínas implicadas en la reabsorción de cloro en la parte ascendente del asa de Henle: el gen *SLC12A1* (15q15-21) que codifica el cotransportador sodio-potasio-cloro NKCC2 en el síndrome de Bartter tipo I; el gen *KCNJ1* (11q21-25) que codifica el canal del potasio ROMK en el tipo II; el gen *CLCNKB* (1p36) que codifica el canal basolateral del cloro, en el tipo III; y el gen *BSND* (1p31) que codifica la barttina, una subunidad del canal del cloro, en el tipo IV.

4.2.5 Síndrome de Ellis Van Creveld

El síndrome de Ellis Van Creveld (EVC; OMIM #225500) se asocia a enanismo no armónico con osteocondrodisplasia, junto con polidactilia, desarrollo psicomotor normal, y malformaciones cardíacas del tipo shunt izquierda-derecha. El Síndrome se transmite como un

rasgo autosómico recesivo. Mutaciones en el gen *EVC* y en el gen *EVC2*, ambos localizados en el cromosoma 4 (4p16), se han asociado por igual a este síndrome.

4.2.6 Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz

La Epidermolisis Bullosa Juntural, tipo Herlitz (EBJ-H; OMIM #226700) es un subtipo grave de epidermolisis bullosa juntural caracterizado por ampollas y erosiones extensas, localizadas en la piel y en las membranas mucosas. Las tasas de incidencia descritas son de 1/2.500.000 y 1/1.470.000 nacidos vivos en Estados Unidos e Italia, respectivamente, y de 1/250.000 nacidos vivos en los Países Bajos. La enfermedad se halla presente al nacimiento. La EBJ-H está causada por mutaciones en uno de los genes que codifican la laminina-332: *LAMA3* (18q11.2), *LAMB3* (1q32) y *LAMC2* (1q25-q31). El pronóstico es malo y la mayoría de los pacientes con EBJ-H fallecen durante los primeros años de vida, siendo las principales causas de muerte: retraso en el crecimiento, insuficiencia respiratoria, sepsis y neumonía.

4.2.7 Síndrome de Defecto de Glicosilación tipo 1A

El trastorno congénito de la glicosilación tipo 1A (CDG-1A; OMIM #212065) es la forma más frecuente del Síndrome CDG y se caracteriza por una alta variabilidad de sus manifestaciones clínicas, que pueden incluir problemas de alimentación, vómitos y diarrea, con retraso en el desarrollo, y encefalopatía grave con hipotonía axial, movimiento anormal de los ojos, retraso psicomotor marcado, neuropatía periférica, hipoplasia cerebelosa, episodios parecidos a la apoplejía, y retinosis pigmentaria en la infancia o en la edad adulta. Este síndrome está causado por una deficiencia de fosfomanomutasa 2 (*PMM2*), enzima citosólica que transforma la manosa-6-fosfato en manosa-1-fosfato. El gen *PMM2* se localiza en el cromosoma 16p13.

4.2.8 Síndrome de Disfunción Múltiple Mitocondrial tipo I

El Síndrome de Disfunción Múltiple Mitocondrial (MMDS1; OMIM #605711) se debe a mutaciones en el gen *NFU1*, situado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p15-p13). Este síndrome también puede deberse a mutaciones en el gen *BOLA3* situado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p13.1). Las proteínas codificadas a partir de cada uno de estos genes parecen estar implicadas en la formación de moléculas denominadas grupos de sulfuro de hierro (Fe-S) o en la unión de estos grupos a proteínas. Las proteínas NFU-1 y BOLA3 desempeñan un papel importante en las mitocondrias.

4.3. Enfermedades ligadas al cromosoma X

4.3.1. Retinosquiasis

La retinosquiasis ligada al X (XLR5; OMIM #312700) es una enfermedad ocular genética que se caracteriza por agudeza visual reducida en varones debido a una degeneración macular juvenil. Se estima una prevalencia de entre 1/5.000 y 1/25.000 varones en todo el mundo. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen *RS1*, incluyendo mutaciones de cambio de sentido, sin sentido y del sitio de empalme, deleciones e inserciones. El gen *RS1* codifica para la retinosquiasina una proteína adhesiva que se considera que participa en la integridad estructural y funcional de la retina.

III. APORTACIONES DEL PRESENTE TRABAJO AL DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS

En el presente trabajo se han estudiado mutaciones fetales asociadas a diferentes enfermedades con un patrón de herencia dominante, recesivo y ligado al cromosoma X con independencia del origen parental.

- Se ha aumentado el espectro del estudio de mutaciones paternas asociadas a enfermedades de herencia dominante tales como; Enfermedad de Huntington, Acondroplasia, Epidermolisis Bullosa Distrófica, Síndrome de Rendu Osler Weber, Aniridia, Miopatía Nematónica, Síndrome de Marfan o antígeno antiKell. Así como de herencia recesiva: Fibrosis Quística, Síndrome de Mucopolisacaridosis IIIB, Síndrome de Hipoplasia cartílago-pelo, Síndrome de Bartter, Síndrome de Ellis Van Creveld, Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herliz o Síndrome de defecto de Glicosilación.

- Se ha validado una de las tecnologías de nueva generación recientemente incorporadas como es la PCR Digital, mediante una estrategia de SNPs simulando todas las posibles situaciones en cuanto al modelo de herencia de una mutación puntual independientemente del origen parental (Perlado y cols., 2016).

- Se ha abordado de la mano de dicha tecnología de PCR Digital casos de estudio donde padre, madre o ambos progenitores son portadores de mutaciones asociadas a diferentes patologías. Se incluyen dos casos de herencia recesiva con padres portadores de diferentes mutaciones asociadas a Síndrome de Mucopolisacaridosis IIIB, un caso de Epidermolisis Bullosa Distrófica con patrón de herencia dominante materna, un caso de Disfunción Múltiple Mitocondrial con patrón de herencia recesivo donde ambos progenitores son portadores de la misma mutación y un caso de Retinosquiasis donde la madre es portadora de una enfermedad ligada al cromosoma X.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Abordaje de nuevos diagnósticos genéticos fetales en sangre periférica materna, aumentando así el espectro de estudios fetales no invasivos, con independencia del tipo de herencia y del origen parental.

II. OBJETIVOS CONCRETOS

- 1) Ampliación del número de casos estudiados de enfermedades monogénicas de herencia paterna o por mutaciones “*de novo*” en sangre materna, mediante técnica de minisequenciación o QF-PCR.
- 2) Validación de la técnica de PCR Digital para el estudio de enfermedades monogénicas en sangre materna con independencia del tipo de herencia y del origen parental.
- 3) Aplicación de la tecnología de PCR Digital para el Diagnóstico Prenatal No Invasivo de enfermedades monogénicas en casos reales.
- 4) Desarrollo de diferentes estrategias de estimación de la presencia de ADN fetal en muestras de plasma materno.
- 5) Elaboración de un algoritmo de Diagnóstico Prenatal No Invasivo para el manejo de gestaciones en riesgo de una enfermedad monogénica.

PACIENTES Y MÉTODOS

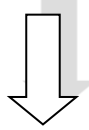
I. ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA



Recogida de 20 cc de sangre periférica materna en tubo EDTA

- 1ª muestra → 7-8 semanas
- 2ª muestra → 9-10 semanas
- 3ª muestra → opcional, 10-15 semanas

Recogida de 10 cc de sangre periférica de la pareja

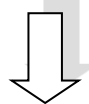


Separación del plasma materno



- 1ª) Centrifugación a 1600 xg durante 10 minutos
- 2ª) Separación del plasma
- 3ª) Centrifugación a 21910 xg durante 10 minutos
- 4ª) Traspaso del sobrenadante a tubo "ependorf"

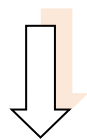
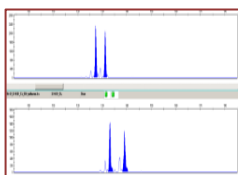
Almacenamiento en el congelador (-20°C)



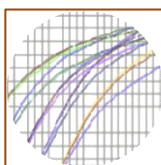
Extracción de ADN a partir del plasma materno mediante el sistema automatizado MagNAPure Compact (Roche, Mannheim, Germany) o también con el protocolo automatizado QIACUBE (Qiagen, Hilden, Germany)



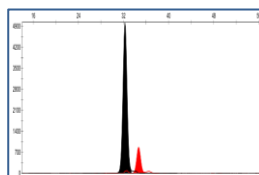
PCR Cuantitativa
Fluorescente
(QF-PCR)



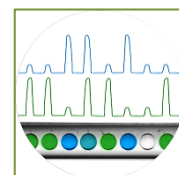
PCR a Tiempo Real
(RT-PCR)



Minisequenciación o
SNaPshot®



PCR Digital
(dPCR)



PACIENTES Y MÉTODOS

I. PACIENTES

Se estudiaron un total de 49 gestaciones de las que se recogió de 1 a 4 muestras de sangre periférica materna entre las 7 y las 27 semanas de gestación. En total se obtuvieron 81 muestras de sangre periférica de gestante.

Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes que participaron en el estudio, de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki.

En función de los objetivos a alcanzar del estudio en plasma materno se establecieron dos grupos de gestantes:

- Gestantes para el Diagnóstico de Enfermedades Monogénicas (*Tabla 1*).
- Gestantes para estudio de validación de la tecnología de PCR Digital (*Tabla 2*).

1. Gestantes para el Diagnóstico de Enfermedades Monogénicas

El objetivo de este estudio era el abordaje de nuevos diagnósticos genéticos fetales en sangre periférica materna en parejas con riesgo de transmitir alguna enfermedad de herencia mendeliana. Se estudiaron un total de 34 gestaciones diferentes (*Tabla 1*). Las parejas portadoras de alguna enfermedad monogénica acudieron a Consulta de Consejo Genético previo al DP, donde se les ofreció la recogida de muestra de sangre periférica para participar en el estudio de DPNI.

Los casos de estudio han sido subdivididos en función del origen de la mutación a estudio (paterna o “*de novo*”, materna, o ambas).

- Casos con abordaje de mutación paterna o “*de novo*”: 29/34 gestaciones.
- Casos con doble abordaje de mutación paterna y materna: 3/34 gestaciones.
- Casos con abordaje de mutación materna: 2/34 gestaciones.

1.1 Casos de estudio con abordaje de mutación paterna o “*de novo*”

Se estudiaron 29 gestaciones en las que el feto presentaba riesgo de heredar una enfermedad monogénica por: 1) vía paterna, o 2) presentar una enfermedad asociada a una mutación “*de novo*”. Las gestaciones incluidas fueron seleccionadas por tener historia familiar

de enfermedad monogénica (24 casos) o por parámetros ecográficos alterados sugestivos de una displasia ósea, asociadas en muchos casos a una mutación “*de novo*” (5 casos).

➤ Caso 1: Isoinmunización del antígeno Kell

Pareja con varón portador del cambio c.578 C>T; p.Thr193Met en el exón 6 del gen *KEL* (OMIM *613883) localizado en el cromosoma 7 (7q34), responsable del fenotipo KELL (Kk) causante de un tipo de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHRN). Con un patrón de herencia autosómico codominante.

Gestante con antecedentes de dos abortos y dos hijos con anemia al nacimiento. En la quinta gestación se recogieron muestras de plasma materno a las 12 y 15 semanas de gestación con el fin de conocer el genotipo fetal y definir el manejo clínico de la gestación. El abordaje utilizado fue la técnica de minisequenciación. No se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 2: Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante

Pareja con varón portador de la mutación c.5381G>A; p.Gly1794Glu en el exón 61 del gen *COL7A1* (OMIM *120120) localizado en el cromosoma 3 (3p21.1), responsable de Epidermolisis Bullosa Distrófica, con patrón de herencia autosómico dominante. El *probandus* presentaba una clínica muy leve.

La pareja acudió a la consulta de asesoramiento genético y se recogió muestra de plasma materno a las 10 semanas de gestación. El abordaje utilizado para el estudio de la mutación paterna fue la técnica de minisequenciación. No se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 3: Síndrome de Rendu Osler Weber

Pareja con varón portador de la mutación c.1414C>T; p.Gln472* en el exón 11 del gen *ENG* (OMIM *131196) localizado en el cromosoma 9 (9q34.11), responsable del Síndrome de Rendu Osler Weber, patología con un patrón de herencia autosómico dominante.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 12 semanas de gestación. El abordaje utilizado para el estudio de la mutación de origen paterno fue la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 4: Aniridia

Pareja con varón portador de la mutación “*de novo*” c.949 C>T; p.Arg317* en el exón 11 del gen *PAX6* (OMIM *607108) localizado en el cromosoma 11 (11p13), responsable de Aniridia y con patrón de herencia autosómico dominante.

Se recogió muestra de plasma materno a las 12 semanas de gestación. El abordaje utilizado para el estudio de la mutación de origen paterno fue la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 5: Miopatía Nemalínica

Pareja con una hija previa afecta de Miopatía Nemalínica por una mutación “*de novo*” c.413 T>A; p.Ile138Asn en el exón 3 del gen *ACTA1* (OMIM *102610) localizado en el cromosoma 1 (1q42.13). Patología con un patrón de herencia autosómico dominante. Ninguno de los dos miembros de la pareja era portador de la mutación.

En una segunda gestación, se recogieron muestras de plasma materno a las 9 y 11 semanas de gestación. El abordaje utilizado para el estudio de la mutación fue mediante técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 6: Síndrome de Marfan

Pareja con varón portador de la mutación c.7636 G>A; p.Gly2546Arg en el exón 62 del gen *FBN1* (OMIM *134797) localizado en el cromosoma 15 (15q21.1) y responsable del Síndrome de Marfan. Enfermedad con patrón de herencia autosómico dominante.

En una gestación lograda tras un Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), se recogieron muestras de plasma materno a las 11 y 13 semanas de gestación con el fin de confirmar el diagnóstico previo. Se realizó el estudio de la mutación paterna mediante técnica de minisequenciación y el estudio indirecto de haplotipos a partir de los marcadores flanqueantes al gen *FBN1* (Tabla 11) mediante técnica de QF-PCR. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 7: Síndrome de Marfan

Pareja con varón portador de la mutación “*de novo*” c.7776 C>A; p.Cys2592* en el exón 63 del gen de fibrilina-1 (*FBN1*) localizado en el cromosoma 15 (15q21.1), responsable del Síndrome de Marfan.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 8 y 10 semanas de gestación. Se llevó a cabo el estudio directo de la mutación mediante técnica de minisequenciación y el estudio indirecto de haplotipos a partir de los marcadores flanqueantes al gen *FBN1* (Tabla 11) mediante técnica de QF-PCR. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Casos 8 al 17: Enfermedad de Huntington

Se estudiaron un total de diez gestaciones en las que el varón era portador de un alelo expandido con más de 40 repeticiones CAG, en el exón 1 del gen *HTT* (OMIM *613004) localizado en el cromosoma 4 (4p16.3), responsable de la Enfermedad de Huntington. Patología con un patrón de herencia autosómico dominante.

Se recogieron diferentes muestras de plasma materno a diferentes semanas de gestación (Tabla 1). En todos los casos se realizó el estudio directo de las repeticiones CAG mediante técnica de QF-PCR. Además, se llevó a cabo el estudio indirecto por haplotipos a partir de los marcadores flanqueantes al gen *HTT* (Tabla 12) mediante la misma técnica (a excepción del caso 8).

➤ Casos 18 al 22: Acondroplasia

Se estudiaron cinco gestaciones independientes sin historia familiar previa de displasias esqueléticas, pero con parámetros ecográficos alterados sugestivos de la presencia de una displasia esquelética en el feto (acortamiento de los huesos largos y frente prominente, entre otros). Se estudió la mutación más frecuente asociada a la enfermedad de Acondroplasia c.1138 G>A; p.Gly380Arg localizada en el exón 10 del gen *FGFR3* (OMIM *134934) localizado en el cromosoma 4 (4p16.3), la cual es responsable del 98% de los casos de dicha patología. La enfermedad de Acondroplasia presenta un patrón de herencia autosómico dominante.

El estudio en sangre materna de la mutación c.1138 G>A se llevó a cabo mediante técnica de minisequenciación en todos los casos. Todas las muestras de plasma materno se recogieron entre las 25 y las 27 semanas de gestación (Tabla 1).

➤ Caso 23: Síndrome de Bartter

Pareja con varón portador de la mutación c.1783 C>T; p.Arg595* en el exón 16 del gen *CLCNKB* (OMIM *602023) localizado en el cromosoma 1 (1p36.13) y gestante portadora de la mutación c.610 G>A; p.Ala204Thr en el exón 6 del mismo gen, responsable del Síndrome de Bartter. Se trata de una enfermedad monogénica con patrón de herencia autosómico recesivo.

Para conocer el estatus del feto respecto a la mutación de origen paterno, se recogieron muestras de plasma materno a las 8,10 y 12 semanas de gestación. Se realizó el estudio de la mutación c.1783 C>T mediante la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 24: Síndrome de Ellis Van Creveld

Pareja con varón portador de la mutación c.2029 C>T; p.Arg677* en el exón 13 del gen *EVC2* (OMIM *607261) localizado en el cromosoma 4 (4p16.2) y gestante portadora de la mutación c.645 G>A; p.Trp215* en el exón 5 del mismo gen. Mutaciones en el gen *EVC2* se asocian con Síndrome de Ellis Van Creveld cuyo patrón de herencia es autosómico recesivo.

Para conocer el estatus del feto respecto a la mutación de origen paterno se recogieron muestras de plasma materno a las 9 y 12 semanas de gestación. El abordaje para el estudio de la mutación paterna fue mediante la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 25: Hipoplasia de cartílago-pelo

Pareja en la que ambos progenitores eran portadores de una mutación diferente asociada a hipoplasia de cartílago-pelo o condrodisplasia metafisaria tipo McKusick, con un hijo previo afecto de dicha enfermedad. El padre era portador de la mutación g.236 A>G en el exón 1 del gen *RMRP* (OMIM *157660) localizado en el cromosoma 9 (9p21.p12) y la madre portadora de la mutación g.258 G>A en el exón 1 del mismo gen.

Ante una nueva gestación, se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 12 semanas de gestación. Se llevó a cabo el estudio directo de la mutación paterna mediante técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 26: Fibrosis Quística

Pareja con varón portador de la mutación c.3484 C>T; p.Arg1162* en el exón 22 del gen *CFTR* (OMIM *602421) localizado en el cromosoma 7 (7q31.2) y gestante portadora de la mutación c.3846 G>A; p.Trp1282* en el exón 23 del mismo gen. Las mutaciones en el gen *CFTR* son responsables de Fibrosis Quística, patología con patrón de herencia autosómico recesivo.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 7 y 10 semanas de gestación. Se emplearon dos abordajes; el estudio directo de la mutación paterna mediante la técnica de minisequenciación, y el estudio indirecto por haplotipos a partir de los marcadores flanqueantes al gen *CFTR* (Tabla 13) mediante técnica de QF-PCR. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 27: Fibrosis Quística

Segundo embarazo de la pareja previamente presentada en el caso 26. En esta ocasión se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 11 semanas de gestación y de nuevo se realizó el doble abordaje mediante técnica de minisequenciación y de QF-PCR. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 28: Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz

Pareja con varón portador de la mutación c.2074 C>T; p.Gln692* en el exón 14 del gen *LAMC2* (OMIM *150292) localizada en el cromosoma 1 (1q25-q31) y gestante portadora de una delección de dos pares de bases (guanina-timina) c.3343_3344delGT; p.Val1115ArgArgfs1*, localizada en el exón 23 del mismo gen. Mutaciones en el gen *LAMC2* son responsables de Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz, enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 12 semanas de gestación. Se llevó a cabo el estudio directo de la mutación paterna mediante la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 29: Defecto Congénito de Glicosilación tipo 1A

Pareja con varón portador de la mutación c.710 C>T; p.Thr237Met en el exón 8 del gen de la fosfomutasa 2, *PMM2* (OMIM *601786) localizado en el cromosoma 16 (16p13) y gestante portadora de la mutación c.470 T>C; p.Phe157Ser en el exón 6 del mismo gen. Las mutaciones en dicho gen se asocian a Defecto Congénito de Glicosilación tipo 1A, patología que presenta un patrón de herencia autosómico recesivo.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 7, 9 y 11 semanas de gestación. Se llevó a cabo el estudio directo de la mutación paterna mediante la técnica de minisequenciación. Se realizó prueba de DP convencional

1.2 Casos de estudio con abordaje de mutación paterna y materna

Se realizó el estudio en tres gestaciones; dos de ellas (casos 30 y 31) con un patrón de herencia autosómico recesivo donde ambos progenitores eran portadores de mutaciones distintas en el mismo gen y en la tercera gestación (caso 32), los padres eran portadores de la misma mutación responsable de la enfermedad.

➤ Caso 30: Mucopolisacaridosis tipo IIIB

Pareja en la que ambos progenitores eran portadores de una mutación diferente asociada al Síndrome de San Filippo o Mucopolisacaridosis tipo IIIB, caracterizadas tras un hijo previo afecto de dicha enfermedad. El varón era portador de la mutación c.503 G>A; p.Trp168* en el exón 2 del gen *NAGLU* (OMIM *609701) localizado en el cromosoma 17 (17p21) y la gestante era portadora de la mutación c.1696 C>T; p.Gln566* en el exón 6 del mismo gen.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 10 y 12 semanas de gestación. Para conocer el estatus del feto respecto a la mutación de origen paterno se abordó el estudio del cambio (c.503 G>A) mediante la técnica de minisequenciación y de PCR Digital. Para el estudio de la mutación materna (c.1696 C>T) la metodología empleada fue la técnica de PCR Digital. Adicionalmente, se realizó un estudio indirecto de haplotipos a partir de los marcadores flanqueantes al gen *NAGLU* (Tabla 14) mediante técnica de QF-PCR. Se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 31: Mucopolisacaridosis tipo IIIB

Segunda gestación de la pareja descrita en el caso 30, en la que se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 12 semanas de gestación. El abordaje técnico fue el descrito para el abordaje en la gestación anterior (Caso 30). De nuevo, la pareja se realizó prueba de DP convencional.

➤ Caso 32: Dísfunción Múltiple Mitocondrial

Pareja en la que ambos progenitores eran portadores de la misma mutación c.622 G>T; p.Gly208Cys en el exón 7 del gen *NFU1* (OMIM *608100) localizado en el cromosoma 2 (2p13.3) responsable del Síndrome de Dísfunción Múltiple Mitocondrial. Patología que presenta un patrón de herencia autosómico recesivo.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 10 y 11 semanas de gestación. El abordaje empleado para determinar el estatus fetal respecto a la enfermedad fue la PCR Digital. La pareja se realizó una prueba de DP convencional.

1.3 Casos de estudio para abordaje de mutaciones maternas

Este abordaje se realizó en dos gestaciones (casos 33 y 34) donde la madre era portadora de la mutación causante de la enfermedad.

➤ Caso 33: Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante

Gestación con mujer portadora de la mutación c.5381 G>A; p.Gly1794Glu en el exón 61 del gen *COL7A1* (OMIM *120120) localizado en el cromosoma 3 (3p21.1), responsable de Epidermolisis Bullosa Distrófica, con patrón de herencia autosómico dominante.

Se recogió muestra de plasma materno a las 20 semanas de gestación. El abordaje empleado para el estudio de la mutación materna en plasma materno fue la PCR Digital. La pareja se realizó una prueba de DP convencional.

➤ Caso 34: Retinosquiasis

Gestación con mujer portadora de la mutación c.26G>A; p.Arg209His en el exón 6 del gen *RS1* (OMIM *300839) localizada en el cromosoma X (Xp22.13) responsable de Retinosquiasis. Patología que presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X.

Se recogieron muestras de plasma materno a las 8, 10 y 12 semanas de gestación. El abordaje empleado fue la técnica de PCR Digital. La pareja no se realizó prueba de DP convencional.

En la siguiente tabla se resumen las características de los 34 casos de estudio de gestantes con riesgo de transmisión de alguna enfermedad monogénica.

Nº de Caso	Enfermedades monogénicas	Patrón de herencia	Gen	Mutación/es	Motivo de consulta	Semanas de Gestación				Estudio de DPNI		Muestras de DP
						M1	M2	M3	M4	Abordaje Directo	Abordaje Indirecto	
Caso 1	Antígeno Anti-KELL (OMIM #110900)	AD paterna	<i>KEL</i> (NM_000420) (NP_000411)	♂ c.578 C>T p.Thr193Met	Historia Familiar	12	15	/	/	Minisec	NO	No DP
Caso 2	Epidermolisis Bullosa Distrófica (OMIM #131750)	AD paterna	<i>COL7A1</i> (NM_000094) (NP_000085)	♂ c.5381 G>A p.Gly1794Glu	Historia Familiar	10	/	/	/	Minisec	NO	No DP

Nº de Caso	Enfermedades monogénicas	Patrón de herencia	Gen	Mutación/es	Motivo de consulta	Semanas de Gestación				Estudio de DPNI		Muestras de DP
						M1	M2	M3	M4	Abordaje Directo	Abordaje Indirecto	
Caso 3	Síndrome de Rendu Osler Weber (OMIM #187300)	AD paterna	ENG (NM_000118) (NP_000109)	♂ c.1414 C>T p.Gln472*	Historia familiar	8	10	12	/	Minisec	NO	BC
Caso 4	Aniridia (OMIM #106210)	AD paterna	PAX6 (NM_001604) (NP_000271)	♂ c.949 C>T p.Arg317*	Historia Familiar	12	/	/	/	Minisec	NO	BC
Caso 5	Síndrome de Miopatía NemaIínica (OMIM #161800)	AD "de novo"	ACTA1 (NM_001100) (NP_001091)	c.413 T>A p.Ile138Asn	Historia familiar	9	11	/	/	Minisec	NO	BC
Caso 6	Síndrome de Marfan (OMIM #154700)	AD paterna	FBN1 (NM_000138) (NP_000129)	♂ c.7636 G>A p.Gly2546Arg	Historia Familiar	11	13	/	/	Minisec	QF-PCR	BC
Caso 7	Síndrome de Marfan (OMIM #154700)	AD paterna	FBN1 (NM_000138) (NP_000129)	♂ c.7776 C>A p.Cys2592*	Historia familiar	8	10	/	/	Minisec	QF-PCR	BC
Caso 8	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	11	/	/	/	QF-PCR	NO	BC
Caso 9	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	12	/	/	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 10	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	10	/	/	QF-PCR	QF-PCR	No DP
Caso 11	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	/	/	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 12	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	9	10	/	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 13	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	/	/	/	QF-PCR	QF-PCR	No DP
Caso 14	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	10	12	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 15	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	12	/	/	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 16	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	10	12	24	QF-PCR	QF-PCR	No DP
Caso 17	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111) (NP_002102)	♂ Repeticiones CAG	Historia Familiar	8	10	/	/	QF-PCR	QF-PCR	BC
Caso 18	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo "	FGFR3 (NM_000142) (NP_000133)	c.1138 G>A p.Gly380Arg	Parámetros ecográficos alterados	25	/	/	/	Minisec	NO	BC
Caso 19	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo "	FGFR3 (NM_000142) (NP_000133)	c.1138 G>A p.Gly380Arg	Parámetros ecográficos alterados	26	/	/	/	Minisec	NO	No DP
Caso 20	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo "	FGFR3 (NM_000142) (NP_000133)	c.1138 G>A p.Gly380Arg	Parámetros ecográficos alterados	27	/	/	/	Minisec	NO	LA

Nº de Caso	Enfermedades monogénicas	Patrón de herencia	Gen	Mutación/es	Motivo de consulta	Semanas de Gestación				Estudio de DPNI		Muestras de DP
						M1	M2	M3	M4	Abordaje Directo	Abordaje Indirecto	
Caso 21	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142) (NP_000133)	c.1138 G>A p.Gly380Arg	Parámetros ecográficos alterados	25	/	/	/	Minisec	NO	No DP
Caso 22	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142) (NP_000133)	c.1138 G>A p.Gly380Arg	Parámetros ecográficos alterados	26	/	/	/	Minisec	NO	No DP
Caso 23	Síndrome de Bartter (OMIM #607364)	AR	CLCNKB (NM_000085) (NP_000076)	♂ c.1783 C>T p.Arg595*	Historia Familiar	8	10	12	/	Minisec	NO	BC
				♀ c.610 G>A p.Ala204Thr						NO	NO	
Caso 24	Síndrome de Ellis Van Creveld (OMIM #225500)	AR	EVC2 (NM_147127) (NP_001159608)	♂ c.2029 C>T p.Arg677*	Historia Familiar	9	12	/	/	Minisec	NO	BC
				♀ c.645 G>A p.Trp215*						NO	NO	
Caso 25	Hipoplasia de Cartilago-pelo (OMIM #250250)	AR	RMRP (NM_003051)	♂ g.236 A>G	Historia Familiar	8	10	12	/	Minisec	NO	BC
				♀ g.258 G>A						NO	NO	
Caso 26	Fibrosis Quística (OMIM #219700)	AR	CFTR (NM_000492) (NP_000483)	♂ c.3484 C>T p.Arg1162*	Historia Familiar	7	10	/	/	Minisec	QF-PCR	BC
				♀ c.3846 G>A p.Trp1282*						NO	NO	
Caso 27	Fibrosis Quística (OMIM #219700)	AR	CFTR (NM_000492) (NP_000483)	♂ c.3484 C>T p.Arg1162*	Historia Familiar	8	10	11	/	Minisec	QF-PCR	BC
				♀ c.3846 G>A p.Trp1282*						NO	NO	
Caso 28	Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz (OMIM #226700)	AR	LAMC2 (NM_005562)	♂ c.2074 C>T p.Gln692*	Historia Familiar	8	10	12	/	Minisec	NO	BC
				♀ c.3343 delGT p.Val1115*						NO	NO	
Caso 29	Defecto de glicosilación (OMIM #212065)	AR	PMM2 (NM_000303) (NP_000294)	♂ c.710 C>T p.Thr237Met	Historia Familiar	7	9	11	/	Minisec	NO	BC
				♀ c.470 T>C p.Phe157Ser						NO	NO	
Caso 30	Síndrome de San Filippo (OMIM #252920)	AR	NAGLU (NM_000263) (NP_000254)	♂ c.503 G>A p.Trp168*	Historia Familiar	10	12	/	/	Minisec y ddPCR	QF-PCR	BC
				♀ c.1696 C>T p.Gln566*						ddPCR	NO	
Caso 31	Síndrome de San Filippo (OMIM #252920)	AR	NAGLU (NM_000263) (NP_000254)	♂ c.503 G>A p.Trp168*	Historia Familiar	8	10	12	/	Minisec y ddPCR	QF-PCR	BC
				♀ c.1696 C>T p.Gln566*						ddPCR	NO	
Caso 32	Disfunción múltiple mitocondrial (OMIM #605711)	AR (=mut)	NFU1 (NM_001002755) (NP_001002755)	♂ c.622 G>T p.Gly208Cys	Historia Familiar	10	11	/	/	ddPCR	NO	BC
Caso 33	Epidemolisis Bullosa Distrófica (OMIM #131750)	AD materna	COL7A1 (NM_000094) (NP_000085)	♀ c.5381 G>A p.Gly1794Glu	Historia Familiar	20	/	/	/	ddPCR	NO	BC
Caso 34	Retinosquisis (OMIM #312700)	Ligada al X	RS1 (NM_000330) (NP_000321)	♀ c.626 G>A p.Arg209His	Historia Familiar	8	10	12	/	ddPCR	NO	No DP

Tabla 1. Características de los casos de estudio del grupo de gestantes para el diagnóstico de enfermedades monogénicas en plasma materno. [Minisec = Minisecuenciación; ddPCR: Droplet Digital PCR; AR= Autosómica Recesiva, AD= Autosómica Dominante; M1= primera muestra de plasma materno; M2= segunda muestra plasma materno; M3=tercera muestra plasma materno y M4= cuarta muestra plasma materno; BC= Biopsia Corial; No DP= No Diagnóstico Prenatal; LA= Líquido Amniótico].

2. Gestantes para el estudio de Validación de la tecnología de PCR Digital

Con la finalidad de conocer el potencial de la técnica de PCR Digital (dPCR) para el estudio de ADN fetal en sangre materna, se llevó a cabo un estudio en 15 parejas que acudieron al servicio de Ginecología y Obstetricia del hospital Fundación Jiménez Díaz para someterse a una prueba de Diagnóstico Prenatal convencional.

Los criterios de inclusión que se establecieron fueron: a) posibilidad de recogida de sangre periférica de los dos miembros de la pareja, b) disponibilidad de muestra prenatal (vellosidad corial o líquido amniótico) para realizar la confirmación de resultados obtenidos en muestras de plasma materno y c) edad gestacional en el momento de recogida de las muestras entre las 8 y las 20 semanas de gestación (*Tabla 2*).

En todas las gestaciones se recogió una única muestra de plasma materno por caso. Todas las parejas firmaron un Consentimiento informado, bajo la declaración de Helsinki.

<i>Casos para la validación de la Tecnología de PCR Digital</i>		
Nº de Caso	Semanas de gestación	Muestras de DP
<i>Control ddPCR 1</i>	11	BC
<i>Control ddPCR 2</i>	12+3	BC
<i>Control ddPCR 3</i>	13	BC
<i>Control ddPCR 4</i>	12	BC
<i>Control ddPCR 5</i>	11+3	BC
<i>Control ddPCR 6</i>	12	BC
<i>Control ddPCR 7</i>	13+2	BC
<i>Control ddPCR 8</i>	12	BC
<i>Control ddPCR 9</i>	13	BC
<i>Control ddPCR 10</i>	17	LA
<i>Control ddPCR 11</i>	15	LA
<i>Control ddPCR 12</i>	15	LA
<i>Control ddPCR 13</i>	16	LA
<i>Control ddPCR 14</i>	20	LA
<i>Control ddPCR 15</i>	16	LA

Tabla 2. Muestras de plasma materno recogidas para el estudio de validación de la técnica de PCR Digital. (DP= Diagnóstico Prenatal; BC= Biopsia Corial; LA= Líquido Amniótico).

II. MÉTODOS

1. Recogida y procesamiento de muestras

Las muestras utilizadas en el estudio se dividen en tres grupos: 1) muestras de plasma materno para el estudio de ADN fetal, 2) muestras de sangre periférica de los progenitores empleadas como controles positivos o negativos y 3) muestras de tejido fetal procedentes de un DP invasivo empleadas para contrastar los resultados del DPNI.

1.1 Muestras de plasma materno para el estudio de ADN fetal

1.1.1 Recogida de muestras de sangre materna

De cada gestante se recogieron entre 1-4 muestras independientes de sangre periférica materna (20 centímetros cúbicos (cc) en tubos con el anticoagulante *EDTA* (*ácido etilendiaminotetraacético*)), entre las 7 y las 27 semanas de gestación (*Tablas 1 y 2*). Se recogieron un total de 81 muestras de sangre periférica materna.

1.1.2 Procesamiento de muestras de plasma materno

El procesamiento de la muestra de sangre periférica para la obtención del plasma materno se detalla a continuación (*Tabla 3*):

Protocolo de procesamiento de muestras de plasma materno

- 1) Primera centrifugación a 1600xg durante 10 minutos
 - 2) Traspaso del sobrenadante (plasma) a tubos eppendorf estériles en alícuotas de 1 ml
 - 3) Segunda centrifugación a 21910 xg durante 10 minutos.
 - 4) Traspaso del sobrenadante (plasma) a tubos eppendorf estériles en alícuotas de 1 ml
 - 5) Almacenamiento en el congelador a -20°C
-

Tabla 3. *Protocolo procesamiento de muestras de plasma materno*

El plasma materno fue procesado en todos los casos durante las 24 horas siguientes a la recogida de la muestra de sangre periférica.

1.2 Muestras de sangre periférica empleadas como controles positivos y negativos

1.2.1. Sangre periférica de gestante

Una vez procesado el plasma materno de la muestra de sangre periférica de la gestante, la fracción celular fue resuspendida en un volumen de suero fisiológico equivalente al que se había retirado de plasma. A partir de dicha fracción se realizó la extracción de ADN materno.

El ADN extraído de la muestra de la gestante se empleó como control negativo en los casos de herencia paterna y como control positivo en los casos de herencia materna.

1.2.2. Sangre periférica de la pareja de la gestante

Se recogieron 10 cc de sangre periférica de la pareja de la gestante en tubos EDTA en todos los casos, excepto en los casos 18 a 22.

El ADN extraído de la sangre periférica paterna se utilizó como control positivo para la mutación en los casos de herencia monogénica vía paterna y como control negativo en los casos de herencia materna.

En el caso 5, se extrajo ADN de sangre periférica de la hija previa afecta como control positivo de la mutación.

En los casos 18 a 22, al tratarse de casos “*de novo*”, no heredados, los controles positivos y negativos empleados procedían de un banco de muestras interno del laboratorio.

1.3 Muestras procedentes de Diagnóstico Prenatal convencional

En un total de 40/49 gestaciones se confirmó el resultado obtenido en plasma materno tras el estudio de muestras fetales obtenidas mediante DP convencional: Biopsia Corial (BC) o Líquido Amniótico (LA).

En 33/49 casos se realizó estudio de confirmación en muestra de vellosidad corial y en 7/49 casos en muestra de líquido amniótico. En los 9/49 casos restantes no se realizó prueba de DP convencional debido a un aborto espontáneo temprano o por decisión de la pareja.

2. Extracción de ADN

2.1 Extracción de ADN de plasma materno

Durante la realización de este trabajo hubo una transición de un método de extracción de ADN (QIACUBE) a otro más automatizado (MagNaPure) (datos no mostrados en el presente trabajo). Dado que el protocolo MagNaPure Compact reduce la manipulación de la muestra y el tiempo de extracción frente a la extracción en el QIACUBE, a partir del año 2012 se utilizó de manera rutinaria el sistema MagNaPure Compact.

Protocolos automatizados para la extracción de plasma materno (*Tabla 4*):



<i>Protocolo de Extracción de ADN de Plasma Materno</i>	
<p>➤ Protocolo extractor comercial de minicolumnas (QIAmp DNA Blood MiniKit) automatizado en el QIACUBE (Qiagen Inc., Hilden, Germany).</p>	
<p>➤ Protocolo automatizado en el extractor MagNaPure Compact (Roche, Mannheim, Germany) Se empleó el MagNaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 Large Volume (Roche) siguiendo el protocolo Total NA Plasma 1000 v3 y las recomendaciones del fabricante.</p>	
<p><i>En ambos casos se extrajo el ADN total a partir de una alícuota de 1 ml de plasma materno y el ADN fue eluído en 50 µl.</i></p>	

Tabla 4. Protocolo de extracción de ADN de plasma materno.

2.2 Extracción de ADN de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica empleadas como controles positivos y negativos fueron extraídas de la siguiente manera (*Tabla 5*):

<i>Protocolo de Extracción de ADN de Sangre Periférica</i>
<p>La extracción de ADN de sangre periférica de los controles positivos y negativos se realizó a partir de 350 µl de sangre con el extractor "BioRobot EZ1" (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo establecido para sangre con un volumen de elución de 100 µl.</p>

Tabla 5. Protocolo de extracción de ADN de Sangre Periférica.

2.3 Extracción de ADN de muestras fetales

2.3.1 Extracción de ADN de Vellosidad Corial

La extracción de ADN a partir de muestra de Vellosidad Corial se muestra en el siguiente cuadro (Tabla 6):

<i>Protocolo de Extracción de ADN de Vellosidad Corial</i>	
1)	Una vez recogida la muestra mediante biopsia transvaginal, la vellosidad corial se disgregó mecánicamente y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
2)	Se añadió 750 µl de suero fisiológico (NaCl 0.9%) para su lavado, se homogeneizó y se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur. Este paso se realizó tres veces consecutivas.
3)	Se añadieron 10 µl de proteinasa K y 190 µl de Buffer G2 (Qiagen, Hilden, Alemania). Se homogeneizó vigorosamente y se incubó en la estufa a 56º C durante toda la noche.
4)	Finalmente se extrajo el ADN en el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó el protocolo "EZ1 DNA Tissue Card" y los reactivos específicos de tejido "EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit", eluyendo las muestras en 100 µl.

Tabla 6. Protocolo de extracción de ADN de Vellosidad Corial.

2.3.2 Extracción de ADN de Líquido Amniótico

La extracción de ADN a partir de muestra de Líquido Amniótico se muestra en el siguiente cuadro (Tabla 7):

<i>Protocolo de Extracción de ADN de Líquido Amniótico</i>	
1)	Se transfirieron 1,5 ml de líquido amniótico a un tubo cónico de 2 ml y se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm.
2)	Se decantó el sobrenadante y se añadió al tubo truncado 10 µl de Proteinasa K y 190 µl del tampón Buffer G2 (Qiagen, Hilden, Alemania). Se incubó durante 15 minutos a 56º C en la estufa.
3)	Se extrajo el ADN en el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó el protocolo "DNA forensic Card" y los reactivos de tejido "Forensic 350 µl Reagent Cartridges" eluyendo las muestras en 100 µl.

Tabla 7. Protocolo de extracción de ADN de Líquido Amniótico.

El abordaje metodológico empleado para poder alcanzar los diferentes objetivos establecidos en el presente trabajo fue distinto según el estudio a realizar. Han sido cuatro las técnicas empleadas en función de la base genética de las enfermedades y del objetivo a alcanzar.

III. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

1. PCR Cuantitativa Fluorescente (QF-PCR)

La técnica QF-PCR está basada en la amplificación y detección semicuantitativa de segmentos de ácido desoxirribonucleico de determinados cromosomas, permitiendo conocer la dosis genómica de la región amplificada (Adinolfi y cols., 1997). Se emplean cebadores marcados con fluorocromos, que se incorporan a los productos de la reacción y son detectados como amplicones de diferente tamaño (en pares de bases, pb) e intensidad de fluorescencia, tras someter el producto de amplificado a electroforesis capilar.

Mediante esta técnica se realiza la amplificación de secuencias del tipo microsatélite, también llamadas STRs (*del inglés Short Tandem Repeats*). Las secuencias STRs son polimórficas y varían de longitud entre los distintos individuos, dependiendo del número de veces que se repiten los di-,tri-,tetra- o pentanucleótidos que las componen.

La aproximación experimental mediante técnica de QF-PCR ha sido utilizada en el presente trabajo, con dos propósitos: 1) por un lado el estudio directo de mutaciones dinámicas (casos 8 al 17) y 2) para el estudio indirecto mediante análisis de haplotipos de STRs flanqueantes al gen de interés como aproximación complementaria tras el estudio directo de mutaciones de origen paterno (casos 6-7, 8-17, 26-27 y 30-31) (*Tabla 2*).

En la *Tabla 8* se muestran las condiciones que fueron utilizadas para amplificar las distintas regiones microsatélite modificando únicamente la T^a de hibridación óptima (T^a_h) para cada marcador.

PROTOCOLO de QF-PCR		
<u>Reacción de PCR :</u>	<u>Condiciones de PCR</u>	
Volumen final de 25 µl	94º-15 min	
✓ 12.5 µl de PCR Multiplex MasterMix (Qiagen).	96º- 30 seg,	
✓ 2.5 µl de Buffer Q (Qiagen).	Tªh-1 min	} 10 ciclos
✓ 1 µl de cada cebador (F y R) (Tablas 9, 11, 12, 13 y 14)	72º-1 min 30 seg,	
✓ 8 µl de ADN de plasma materno.	94º-30 seg	} 20 ciclos para puesta a punto /30 ciclos para estudio plasma materno
(Para ADN genómico 1 µl de ADN y 7 µl de agua).	Tª h- 1min	
	72º-1 min	
	72º-15 min	
	4º- ∞	

Tabla 8. Protocolo de la técnica de QF-PCR.

1.1 QF-PCR aplicada al estudio de mutaciones dinámicas

En los casos 8 a 17, con indicación de enfermedad de Huntington, se estudió la zona repetida de trinucleótidos CAG en el gen *HTT* mediante dos parejas de cebadores:

- **Repeticiones CAG:** Cebadores que amplifican la región repetida CAG que codifica para un tracto poli-glutamina (Tabla 9).
- **Repeticiones CAG-CGG:** Cebadores que amplifican la región repetida CAG y CGG que codifica para un tracto poli-glutamina seguido de un tracto poli-prolina (Tabla 9).

Estudio Directo de mutaciones dinámicas del gen <i>HTT</i>			
Marcadores	Cebadores	Fluorocromo	Tª h
Repeticiones CAG	F: 5´ - ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAA-3´	NED	65º
	R: 5´ - GGCGGTGGCGGCTGTTGCTGC-3´		
Repeticiones CAG-CGG	F: 5´ - ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGA-3´	6-FAM	58º
	R: 5´ - GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA-3´		

Tabla 9. Marcadores empleados para el estudio directo del gen *HTT*. Secuencia de los cebadores, fluorocromo y Tª de hibridación específica.

1.2 QF-PCR aplicada al estudio de marcadores STRs para análisis de haplotipos

En los casos 6-7 (Síndrome de Marfan), 8-17 (Enfermedad de Huntington), 26-27 (Fibrosis Quística), 30-31 (Síndrome de San Filippo), se realizó un estudio indirecto de haplotipos de la región flanqueante al gen responsable de la patología, según el siguiente diseño experimental (Tabla 10).

Diseño experimental para el estudio de haplotipos mediante QF-PCR

- 1) Búsqueda de los marcadores microsatélite o STRs flanqueantes al gen de interés (< 1 Mb)
- 2) Estudio de los STRs en la unidad familiar y construcción de haplotipos
- 3) Selección de los marcadores informativos en la pareja
- 4) Establecimiento del umbral de detección de la técnica para el estudio de STRs
- 5) Estudio de los marcadores informativos seleccionados en muestra de plasma materno

Tabla 10. Diseño experimental para el análisis de haplotipos mediante técnica de QF-PCR.

A continuación se muestran las secuencias de los cebadores empleados para amplificar los marcadores microsatélites flanqueantes a los genes *FBN1*, *HTT*, *CFTR* y *NAGLU* (Tablas 11-14).

Marcadores microsatélites flanqueantes al gen FBN1 (Síndrome de Marfan)			
Marcadores	Cebadores	Fluorocromo	Tº h
D15S119	F:5´- AACAGAAAATCCGTAACATAACATA-3´	FAM	58º
	R:5´- ACTTTTGTGCCATTTAGAGATT-3´		
D15S126	F:5´- GTGAGCCAAGATGGCACTAC-3´	NED	58º
	R:5´- GCCAGCAATAATGGGAAGTT-3´		
D15S1028	F:5´- TGCCTGAAATCCCAAC-3´	VIC	58º
	R:5´- GAACTGTGCTCTGTGCTC-3´		
D15S143	F:5´- AATTGATTAGCCTACCCACTG-3´	PET	58º
	R:5´- TCCTAGACTCCTACATGTTTGTG-3´		
MTS2	F:5´-GTAGTTGTTATCTTGCAGA-3´	FAM	58º
	R: 5´-CTGCCCTCTAGGACTCTAAG-3´		
MTS3	F: 5´ - GAGTACATAGAGTGTTTTAGGG-3´	NED	63º
	R: 5´ - CCTGGCTACCATTCAACTCCC-3´		
MTS4	F: 5´-GATGTCCCTATTGCCATCACCAC-3´	NED	56º
	R: 5´-CCTGTGCAGGGTAAGACAAG-3		

Tabla 11. Microsatélites flanqueantes al gen *FBN1* asociado a Síndrome de Marfan.

Marcadores microsatélites flanqueantes al gen HTT (Enfermedad de Huntington)			
Marcadores	Cebadores	Fluorocromo	Tº h
D4S126	F: 5' - GCATGTACTGTGAAGCCATAGTA-3'	VIC	55º
	R: 5' - TTGCCCTGGCTTCACTGTGCCTCAA-3'		
D4S127	F: 5' - CCTCTGTTTGCAATCCATTT-3'	6-FAM	60º
	R: 5' - GTCCCTTGCATGCCCTGGCT-3'		
D4S182	F: 5' - GCCTTGGGGCAGGGGCCGGTGAGTA-3'	HEX	55º
	R: 5' - TCTATGAATTTCAAGGTGGCCATCT-3'		
11CAHD	F: 5' - TATGCCACTACTACAA-3'	VIC	55º
	R: 5' - ACCAGCATGTGGTATTGTCAAAGTG-3'		

Tabla 12. Microsatélites flanqueantes al gen HTT asociado a Enfermedad de Huntington.

Marcadores microsatélites flanqueantes al gen CFTR (Fibrosis Quística)			
Marcadores	Cebadores	Fluorocromo	Tº h
D7S655	F: 5' - GAATAAAGTTGGAGGATTGACA-3'	6-FAM	55º
	R: 5' - ATTTATGTGACTGTACTTTAGGGC-3'		
D7S2847	F: 5' - TCACCTTCAGAAAGTATTGCC-3'	NED	55º
	R: 5' - TGAGGTGTTTCTCAAGCTC-3'		
D7S486	F: 5' - AAAGCCAATGGTATATCCC-3'	6-FAM	55º
	R: 5' - GCCCAGGTGATTGATAGTGC-3'		
CFTR1	F: 5' - TCTTTTCTGTCTGTGCTGCATTC-3'	6-FAM	55º
	R: 5' - GAACAATTGCATGCCAGCCT-3'		
IVS17bTA	F: 5' - GACAATCTGTGTGCATCG-3'	VIC	55º
	R: 5' - GCTGCATTCTATAGTTATC-3'		
IVS17bCA	F: 5' - TGTCACCTTTCATACTCAT- 3'	6-FAM	55º
	R: 5' - AAACCTACCGACAAGAGGAA- 3'		

Tabla 13. Microsatélites flanqueantes al gen CFTR asociado a Fibrosis Quística.

Marcadores microsatélites flanqueantes al gen NAGLU (Síndrome de San Filippo)			
Marcadores	Cebadores	Fluorocromo	Tº h
D17S702	F: 5' - AGCAACACATATCAGGGGC-3'	FAM	58º
	R: 5' - TGTAGGTTGACCTTAAGGC-3'		
D17S1787	F: 5' - GCTGATCTGAAGCCAATGA-3'	FAM	58º
	R: 5' - TACATGAAGGCATGGTCTG-3'		
D17S1801	F: 5' - ATCCTCCCACCTCAGC-3'	FAM	58º
	R: 5' - ATGAAAATGAAATTACAAACAATC-3'		
D17S855	F: 5' - GCTAAAATACACGGATGG-3'	HEX	58º
	R: 5' - TGCAAGACTGCGTCTC-3'		
D17SS902	F: 5' - GAGGTTGCAGTGAGTTGAGA-3'	HEX	58º
	R: 5' - GGAACATCCTCCTTCACTCTT-3'		
D17S951	F: 5' - GGCCTCCCAAAGTCTT-3'	HEX	58º
	R: 5' - TCTACCCCGATGAGCCA-3'		

Tabla 14. Microsatélites flanqueantes al gen NAGLU asociado a Síndrome de San Filippo.

En ambas aplicaciones de la QF-PCR, el producto de PCR fue analizado mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA). Se mezcló 1 µl de producto final de la reacción, junto con 0,5 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan GS500LIZ) y 12 µl de formamida ultra pura. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante el programa informático GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA).

2. PCR a Tiempo Real (RT-PCR)

El principio de la técnica de PCR a Tiempo Real consiste en una modificación con respecto a la reacción convencional de PCR, mediante el empleo de sondas o moléculas intercalantes marcadas con fluorocromos que permiten la correlación entre la intensidad de fluorescencia y la cantidad del producto de amplificación en cada ciclo de PCR. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena capturadas en cada ciclo.

Existen dos abordajes técnicos: a) Los métodos no específicos que se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que generan una señal fluorescente cuando están intercaladas en la doble hebra. El agente intercalante más usado es el *SYBR Green*; b) Por otro lado están los métodos a partir de sondas específicas de secuencia marcadas con fluorocromos, entre ellas las sondas de hidrólisis o sondas Taqman diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa.

La técnica de PCR a Tiempo Real ha sido empleada a partir del abordaje de sondas Taqman con dos fines: 1) para la determinación del sexo fetal y 2) para el genotipado de SNPs en ADN genómico.

2.1 Determinación de sexo fetal

Aunque esta prueba tiene la finalidad de determinar el sexo fetal en gestaciones en las que existe riesgo de una enfermedad ligada al sexo, en el presente estudio, el objetivo de determinar el sexo fetal era la estimación de la presencia de ADN fetal en las muestras de plasma materno.

El protocolo a seguir se muestra en la *Tabla 15* y las secuencias de los cebadores empleados se recogen en la *Tabla 16*.

PROTOCOLO de RT-PCR para Determinación de Sexo Fetal	
Reacción de PCR :	Condiciones de PCR
Volumen final de 25 µl	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px dashed red; width: 1px; height: 100%;"></div> <div style="margin-left: 10px;"> 50º-2 min 95º- 10 min 95º - 15 seg 60º - 1 min </div> <div style="margin-left: 20px; font-size: 2em;">}</div> <div style="margin-left: 10px;">40 ciclos</div> </div>
✓ 12.5 µl de Taqman Universal PCR Mastermix (<i>Life Technologies</i>)	
✓ 5 µl SRY-F (300nM), SRY-R (900 nM) y SRY-S (200 nM) (Tabla 16)	
2,5 µl GAPDH F y R (300 nM) y GAPDH-S (200 nM) (Tabla 16)	
✓ 0,5 µl/2 µl Agua respectivamente	
✓ 7 µl de ADN de plasma materno (Para ADN genómico 1 µl de ADN y 6 µl de agua)	

Tabla 15. Protocolo empleado para Determinación de sexo fetal en plasma materno mediante tecnología de PCR a Tiempo Real.

Cebadores para Determinación de Sexo Fetal	
GEN	Secuencia
SRY	F: 5'-GCGACCCATGAACGCATT-3'
	R: 5'-GCCATCTTGCGCCTCTGA-3'
	S: 6-FAM CGTGTGGTCTCGCG-MGB
GAPDH	F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'
	R: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'
	S: VIC-AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC-TAMRA

Tabla 16. Secuencias de los cebadores empleados en el estudio de Determinación de Sexo Fetal en plasma materno.

2.2 Genotipado de SNP's en ADN genómico

El genotipado de SNPs en ADN genómico de los padres del feto se realizó en 18 parejas con dos finalidades diferentes: 1) para la confirmación de la presencia de ADN fetal en fetos hembra a partir de una estrategia de SNPs localizados en el cromosoma X (3 casos), y 2) genotipado previo para la selección de casos a considerar en el estudio de validación de la técnica de PCR Digital a partir del estudio de SNPs localizados en el cromosoma X y cromosoma 4 (15 casos).

Para alcanzar ambos propósitos las condiciones de PCR fueron las mismas (Tabla 17), a excepción de los ensayos Taqman que son específicos del SNP a estudiar y que se detallan en la Tabla 18.

PROTOCOLO de RT-PCR para Genotipado de SNPs en ADN genómico	
<u>Reacción de PCR</u>	<u>Condiciones de PCR</u>
Volumen final de 25 µl	
✓ 12.5 µl de Taqman Genotyping Mastermix (<i>Life Technologies</i>)	50º-2 min
✓ 1.25 µl SNP Genotyping Assay (20X) (<i>Tabla 18</i>)	95º- 10 min
✓ 2 µl de ADN genómico a 10 ng/ µl	95º - 15 seg
✓ 9.25 µl de agua	60º - 1 min
(Se estudió cada muestra por duplicado)	40 ciclos

Tabla 17. Protocolo empleado para el genotipado de SNPs en ADN genómico mediante tecnología de PCR a Tiempo Real.

1) Ensayos Taqman para estimación de ADN fetal en fetos hembra	
Ensayos Taqman (SNPs del Cromosoma X) Casos 1,5 y 6	
rs1128363	rs274220
rs233217	rs1883796
rs876068	rs5914432
2) Ensayos Taqman para validación tecnología de PCR Digital	
Ensayos Taqman (SNPs del Cromosoma 4) Controles ddPCR (1-7 y 10-15)	
rs4974667	rs762837
rs4874668	rs612973
rs798750	rs2236995
Ensayo Taqman (SNP del Cromosoma X) Controles ddPCR 2,4,6,8 y 9	
rs1128363	

Tabla 18. Ensayos Taqman empleados para el genotipado de SNPs con el fin de confirmar la presencia de ADN fetal y para genotipado de SNPs con el fin de validar la tecnología de PCR Digital en los casos indicados.

Los datos de amplificación fueron recogidos y analizados con el sistema de PCR a Tiempo Real “Step One Real Time PCR” de (Applied Biosystems).

3 Minisequenciación o SNaPshot®

El método de minisequenciación es una modificación de la secuenciación clásica de Sanger que permite genotipar un único nucleótido de interés. Se basa en la extensión de un cebador no marcado, que termina por su extremo 3' en el nucleótido inmediatamente anterior al SNP/mutación de estudio.

Los nucleótidos *dideoxi* están modificados de forma que no presentan el grupo hidroxilo unido al carbono 3' de la pentosa y actúan como terminadores de la reacción. Están marcados cada uno de ellos con un fluorocromo diferente (G: azul, C: negra, T: roja y A: verde). Así será posible determinar cuál es el genotipo, analizando la fluorescencia del fragmento mediante electroforesis capilar en un secuenciador.

En el presente trabajo, esta técnica ha sido empleada para: 1) el estudio directo de mutaciones puntuales de origen paterno en plasma materno y 2) estudios de estimación de la presencia de ADN fetal estudiando el gen *SRY* en aquellas gestaciones de feto varón o de SNPs informativos del cromosoma X en gestaciones de feto hembra.

3.1 Estudio directo de mutaciones puntuales de origen paterno en plasma materno.

El diseño experimental y el protocolo general empleado en el estudio de SNPs/mutaciones fetales mediante la técnica de minisequenciación se muestra en las *Tablas 19* y *20*.

Diseño experimental para el estudio directo de mutaciones puntuales

- 1) Diseño con el programa informático Ensembl (www.ensembl.org) y UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) de los cebadores y la sonda específica para cada una de las enfermedades, seleccionando en cada caso un amplicón de entre 130-190 pares de bases (*Tabla 21*).
 - 2) Validación del diseño mediante el estudio de un control positivo y negativo.
 - 3) Establecimiento del umbral de detección de la técnica mediante la creación de diluciones artificiales de ADN positivo en ADN negativo para la mutación en cantidades decrecientes (50%, 25%, 10%, 5%, 2%).
 - 4) Estudio de 2-3 muestras independientes de plasma materno recogidas en diferentes semanas (a partir de las 7-8 semanas).
-

Tabla 19. *Diseño experimental para el estudio directo de mutaciones puntuales de origen paterno mediante técnica de minisequenciación.*

PROTOCOLO de Técnica de Minisequenciación (SNaPshot)		
1ª) PRIMERA PCR		
<u>Reacción de PCR</u>		<u>Condiciones de PCR</u>
Volumen final de 25 µl		94º-15 min
✓ 12.5 µl de PCR Multiplex MasterMix (Qiagen)		96º- 30 seg,
✓ 2.5 µl de Buffer Q (Qiagen)		Tªh-1 min
✓ 1 µl de cada cebador (F y R) (Tabla 21)		72º-1 min 30 seg,
✓ 8 µl de ADN de plasma materno. (Para ADN genómico 1 µl de ADN y 7 µl de agua).		94º-30 seg
		Tªh- 1min
		72º-1 min
		72º-15 min
		4º- ∞
		} 10 ciclos
		} 20 ciclos (puesta a punto)/ 30 ciclos (plasma materno)
2ª) PURIFICACIÓN CON COLUMNAS EZNA (Cycle Pure Kit, OMEGA, bio-tek)		
- 20µl de Producto de PCR + 100 µl Buffer CP → Mezclar y poner en columna		
- Centrifugar 13000 rpm durante 1 minuto		
- Añadir 700 µl de Wash Buffer y dejar reposar 1 minuto		
- Centrifugar 13000 rpm y quitar sobrenadante		
- Centrifugar 13000 rpm durante 1 minuto y poner columna en Eppendorf		
- Añadir 30 µl de Buffer EB y volver a centrifugar 13000 rpm durante 1 minuto		
3ª) SEGUNDA PCR de (SNaPshot)		
<u>Reacción de PCR</u>		<u>Condiciones de PCR</u>
Volumen final de 10 µl		
✓ 3 µl de SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (LifeTechnologies)		96º- 20 seg
✓ 1 µl de sonda específica de cada caso (Tabla 21)		50º - 5 seg
✓ 6 µl de ADN de plasma materno. (Para ADN genómico 3µl de ADN y 3 µl de agua).		60º - 30 seg
		} 30 ciclos (puesta a punto) / 35 ciclos (plasma materno)
4ª) PURIFICACIÓN CON ENZIMA SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB, Cleveland, Ohio, USA)		
10µl de Producto de PCR + 1µl ENZIMA SAP + 1,2 µl Buffer de enzima SAP		
37º - 60 min		
75º - 15min		
4º - ∞		

Tabla 20. Protocolo de la técnica de minisequenciación

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA). Se cargó 1 µl de producto final de la reacción, junto con 0,5 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan GS120LIZ) y 12 µl de formamida ultra pura. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante el programa informático Gene Mapper v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA).

En la siguiente tabla se muestran los cebadores y sondas, para cada uno de los casos abordados mediante técnica de minisequenciación (Tabla 21).

Nº Caso	Patología	Gen	Mutación	Cebadores & Sonda	Tºh	Tamaño Amplicón
Caso 1	Antígeno Anti-KELL	KEL	c.578 C>T	F: 5'-ACGGATCCTTATGCTCAGC-3'	58º	128 pb
				R: 5'-GGGAAATGGCCATACTGAC-3'		
				S: 5'-CTTCCTTAAACTTTAACCGAA-3'		
Caso 2	Epidermolisis Bullosa Distrófica	COL7A1	c.5381 G>A	F: 5'-ATGAGCCTGGGTTATCAGAT-3'	60º	172 pb
				R: 5'-ACAACCAGGCAGGACTACCA-3'		
				S: 5'-AGCCGCTGGGCCCTCTG-3'		
Caso 3	Síndrome de Rendu Osler Weber	ENG	c.1414 C>T	F: 5'-CCAGCTGGGCCTCTACCTC-3'	60º	144 pb
				R: 5'-GAAGAAAGCGGAGAGGAAG-3'		
				S: 5'-ATCGAGCCGGGGCAG-3'		
Caso 4	Aniridia	PAX6	c.949 C>T	F: 5'-TTAAACCTGTTTGCTCCGG-3'	63ºC	158 pb
				R: 5'-CTATGCCAGCTTACCATG-3'		
				S: 5'-CTGGCTCCATGTTGGGC-3'		
Caso 5	Miopatía NemaIínica	ACTA1	c.413 T>A	F: 5'-CCACCCTGCTCACCGAG-3'	63º	154 ob
				R: 5'-GGGCACTCACCGGTGGT-3'		
				S: 5'-CGCATGTACGTGGCCA-3'		
Caso 6	Síndrome de Marfan	FBNI	c.7636 G>A	F: 5'-GCCCCCACTGCTTCTCA-3'	60º	197 pb
				R: 5'-CCTCCACAAGGATTACCCAG-3'		
				S: 5'-CATTTGCCAGAACACTCT-3'		
Caso 7	Síndrome de Marfan	FBNI	c.7776 C>A	F: 5'-TCCATCTGGCTTCAGAGAGA-3'	58º	220 pb
				R: 5'-GATAGCCATGCATCTTGAGAGT-3'		
				S: 5'-GGCTACAGGTGCAGCTG-3'		
Casos 8-13	Acondroplasia	FGFR3	c.1138 G>A	F: 5'-AGGAGCTGGTGGAGGCTGA-3'	65º	164 pb
				R: 5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3'		
				S: 5'-GTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTAC-3'		
Caso 23	Síndrome de Bartter	CLCNKB	c.1783 C>T	F: 5'-GAACAGTTCTTGGCTAAGTAGGTG-3'	58º	192 pb
				R: 5'-CAGGAGTACCCACCTGGTG-3'		
				S: 5'-GATCCTGGTGGGCATAGTG-3'		
Caso 24	Síndrome de Ellis Van Creveld	EVC2	c.2029 C>T	F: 5'-AGCAGAAGTTGGACAATGACT-3'	60º	160 pb
				R: 5'-GGCACTTTCTGATACCCATC-3'		
				S: 5'-AAATTAATAACTAAGAGAAGA-3'		
Caso 25	Hipoplasia Cartilago-pelo	RMRP	c.236 A>G	F: 5'-AAAGTCCGCCAAGAAGCGTA-3'	61º	159 pb
				R: 5'-AGACCACGGCTCACTGCA-3'		
				S: 5'-AGTGCGTGTCCGCGCACC-3'		
Casos 26 y 27	Fibrosis Quística	CFTR	c.3484 C>T	F: 5'-GCGACCCATGAACGCATT-3'	58º	157 pb
				R: 5'-GCCATCTTGCGCCTCTGA-3'		
				S: 5'-AACGATTCATCGTGGTCT-3'		
Caso 28	Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz	LAMC2	c.2074 C>T	F: 5'-AGTGCTCATGCTCCCTTTC-3'	58º	143 pb
				R: 5'-AGAGCCCGAACTCTTCC-3'		
				S: 5'-GAGCCAAGAGAACAGCTAC-3'		
Caso 29	Defecto de glicosilación	PMM2	c.710 C>T	F: 5'-TGTCTTTCCAGGGTGGCA-3'	60ºC	122 pb
				R: 5'-TGTCTCTCTAACGTGGGAGC-3'		
				S: 5'-TGACAGCGCCTGAGGACA-3'		
Casos 30 y 31	Síndrome de San Filippo	NAGLU	c.503 G>A	F: 5'-GATAGACTGGATGGCGCT-3'	58º	173 pb
				R: 5'-GCGCAGTGTCTCTCTAGAA-3'		
				S: 5'-CAACTGGCACTGGCCT-3'		

Tabla 21. Cebadores y sondas empleadas, así como la Temperatura de hibridación óptima (Tºh) y el tamaño del amplicón, en los distintos casos abordadas mediante técnica de Minisequenciación.

3.2 Estudios de estimación de la presencia de ADN fetal en plasma materno

Mediante técnica de minisequenciación se estudiaron, en función del sexo fetal, los fetos determinados como varón mediante estudio del gen *SRY* y los fetos hembra mediante estudio de SNPs localizados en el cromosoma X.

1. Estudio del gen *SRY* en fetos varón: casos 3, 18,19, 20,21,23,24 y 25.
2. Estudio SNPs del Cromosoma X en fetos hembra: caso 1.

3.2.1 Estudio del gen *SRY*

El estudio del gen *SRY* mediante técnica de minisequenciación se realizó en los siguientes casos: a) en un ensayo individual en los casos 3,18,19,20,21,23 y 24 y b) en un ensayo en multiplex junto con la mutación paterna en el caso 25. El protocolo a seguir es el mismo que el descrito en la (Tabla 20, pág 46) para el estudio directo de mutaciones paternas.

Gen	Secuencias	Tªh	Tamaño del Amplicón
<i>SRY</i>	F: 5' - GCGACCCATGAACGCATT-3'	58º	54 pb
	R: 5' - GCCATCTTGCGCCTCTGA -3'		
	S: 5' - AACGATTCATCGTGTGGTCT-3'		

Tabla 22. Cebadores y sonda empleados para el estudio del gen *SRY* mediante técnica de minisequenciación.

3.2.2 Estudio de SNPs del Cromosoma X

El abordaje de estimación de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno mediante SNPs del cromosoma X en gestaciones de feto hembra, requiere de un paso previo de genotipado en la pareja objeto de estudio mediante técnica de PCR a Tiempo Real (apartado 2.2, pág 44). Derivado de este estudio de genotipado en la pareja se seleccionan los SNPs informativos, considerando como tales aquellos SNPs homocigotos para un alelo en la gestante y hemocigoto para el otro alelo descrito en la pareja.

Tres parejas se genotiparon (casos 1, 5 y 6) para este estudio (Tabla 18, pág 44) resultando informativa solamente una de ellas (caso 1). Por lo que el estudio de estimación de la presencia de ADN fetal en multiplex con la mutación paterna y el SNP del cromosoma X (rs1883796) se llevó a cabo exclusivamente en el caso 1.

SNP del Cromosoma X	Secuencias	Cambio nucleotídico	Tº h	Tamaño Amplicón
RS1883796	F: 5' - TCCAAAATGGATGCTGTTCT -3'	G > A	58º	174 pb
	R: 5' - TTCTCAGAACAGCATGGACA -3'			
	S: 5' - CCAACATCTGTTTCATAGCA -3'			

Tabla 23. Cebadores y sonda empleados para el estudio de SNPs del cromosoma X mediante técnica de Minisequenciación.

4 Tecnología de PCR Digital

El sistema de PCR digital o tecnología Droplet Digital PCR (ddPCR) proporciona una cuantificación absoluta de las moléculas de ADN de manera muy precisa y sensible (Hindson y cols., 2011). Está optimizado para el empleo de sondas de hidrólisis (TaqMan) y para ensayos con un agente intercalante (EvaGreen). La muestra de ADN se fracciona en 20,000 reacciones independientes de PCR lo que favorece la amplificación de los alelos minoritarios.

La PCR digital QX200 (BioRad, Pleasanton, CA) realiza una medición directa de la intensidad de fluorescencia, sin la necesidad de estándares ni de genes de referencia. El software de análisis *Quantsoft* ajusta la fracción de los negativos a un algoritmo de Poisson para determinar finalmente el número de copias absolutas. La puesta a punto de cada mutación/SNP (ensayo Taqman) a estudio requiere de la realización de un gradiente de temperaturas previo para establecer la Tª de hibridación óptima para cada ensayo.

En este trabajo, la aproximación experimental mediante PCR Digital ha sido utilizada para alcanzar tres objetivos: 1) la detección de alelos paternos en plasma materno; 2) la detección de alelos fetales de origen materno mediante cuantificación relativa de dosis alélica (*RMD-Relative Mutation Dosage*) y 3) la estimación de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno.

Para poder alcanzar los objetivos propuestos se llevó a cabo un estudio previo de validación de la técnica en muestras de plasma materno a partir de una estrategia de SNPs localizados en el cromosoma 4 y en el cromosoma X. La estrategia utilizada permitió simular todas las combinaciones alélicas que se pueden encontrar en los diferentes patrones de herencia de enfermedades monogénicas y con independencia del origen parental (*apartado 4.1*). Posteriormente se incluyeron cinco casos reales (*apartado 4.2*). El protocolo en ambos casos fue el siguiente (*Tabla 24*):

PROTOCOLO de PCR Digital

➤ Preparación del Cóctel

Se preparó el cóctel de PCR para un volumen final de 22 μ l/muestra incluyendo:

- ✓ 11 μ l de ddPCR Mastermix no dUTP for probes (BioRad, Pleasanton, CA)
- ✓ 0.55 μ l de Taqman Pre-Design or Custom Assay (LifeTechnologies, Carlsbad, CA) (Tabla 25)
- ✓ 10.45 μ l de ADN de plasma materno (4-5 réplicas) y 1 μ l de ADN genómico control; ADN paterno (ADNp), ADN materno (ADNm), o ADN fetal (ADNf) a 20 ng/ μ l (2 réplicas).



➤ Generación de gotas

- ✓ En los pocillos de la fila intermedia, se incorporó el cóctel de reactivos de PCR (20 μ l/pocillo).
- ✓ En la fila inferior del cartucho se incorporó el aceite (Droplet Generator Oil. BioRad, Pleasanton, CA).
- ✓ El cartucho se colocó en el generador de gotas QX200 Droplet Generator (BioRad, Pleasanton, CA)
- ✓ Las gotas generadas se recogen en la fila superior del cartucho.



➤ Reacción de PCR

- ✓ Una vez generadas las gotas el producto fue transferido a una placa Eppendorf de 96 pocillos (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- ✓ Se llevó a cabo la reacción de PCR en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, Pleasanton, CA).

95^o-10 min

94^o- 30 seg,

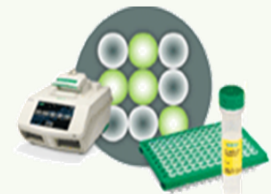
T_ah -1 min

} 40 ciclos

98^o-10 min 30

4^o- ∞

T_ah óptima para cada ensayo Taqman (Tabla 26).



➤ Lectura y análisis de resultados

- ✓ Tras la reacción de PCR, la placa se colocó en el lector QX200 Reader donde leyó la fluorescencia emitida cada una de las gotas donde se ha llevado a cabo la reacción de PCR.
- ✓ Los resultados fueron finalmente analizados en el software QuantaSoft (BioRad).

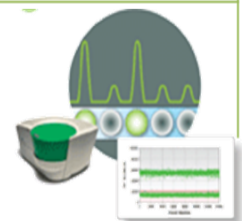


Tabla 24. Protocolo de la técnica de PCR Digital.

En todos los casos se empleó la química de sondas TaqMan mediante el uso de *Pre-Design* o *Custom Taqman Assays* (ThermoFisher, Waltham, EEUU). El diseño de estos ensayos fue realizado por *ThermoFisher, Waltham, EEUU*.

4.1 Estudio de validación de la tecnología de PCR Digital en muestras de plasma materno

Se incluyeron 55 casos en el estudio de validación de la técnica de PCR Digital. Tras el estudio de genotipado mediante técnica de RT-PCR (*apartado 2.2, pág 44*), se seleccionaron 19 casos para detección de alelos fetales de origen paterno y 36 para cuantificación de alelos fetales de origen materno. De estos 36 casos: 18/36 simulaban un patrón de herencia dominante materno; 13/36 enfermedades recesivas con progenitores portadores de la misma mutación y 5/36 enfermedades ligadas al cromosoma X (*Tabla 25*).












	GENOTIPO MATERNO	GENOTIPO PATERNO	ANÁLISIS ALÉLICO PARA SIMULACIÓN DE ENFERMEDADES MONOGENICAS	
ENFERMEDADES AUTOSÓMICAS 6 SNP's (Ch 4)	a)  1/1	 1/2	DETECCIÓN (19 casos)	ENFERMEDADES DOMINANTES PATERNAS
	 2/2			
	b)  1/2	 1/1	RMD (18 casos)	ENFERMEDADES DOMINANTES MTERNAS
		 2/2		
c)  1/2	 1/2	RMD (13 casos)	ENFERMEDADES RECESIVAS (Padres portadores = mutación)	
LIGADAS AL X SNP (Ch X)	d)  1/2	 1 Y	RMD (5 casos)	ENFERMEDADES LIGADAS AL X
	 2 Y			

Tabla 25. Equivalencia de los casos incluidos en la validación de la tecnología de PCR Digital mediante SNPs con casos de enfermedades monogénicas: a) de herencia dominante paterna; b) herencia dominante materna; c) herencia recesiva con padres portadores de la misma mutación y d) enfermedades ligadas al X. (Barra verde: alelo 1 (alelo silvestre) y Barra azul: alelo 2 (alelo mutado)).

4.2 Estudio de mutaciones fetales en plasma materno mediante PCR Digital

Tras el estudio de validación se realizaron cuatro casos reales de enfermedades monogénicas. Dos casos de herencia recesiva con padres portadores de mutaciones diferentes, (casos 30 y 31). Un caso de herencia recesiva con la misma mutación en ambos progenitores (caso 32). Un caso de herencia dominante materna (caso 33) y un caso de herencia ligada al X materno (caso 34).

El protocolo llevado a cabo para alcanzar ambos estudios fue el mismo (*Tabla 24, pág 50*), variando únicamente los ensayos Taqman empleados así como la Tª de hibridación (Tªh) óptima para cada uno de ellos (*Tabla 26*).

1) Ensayos Taqman para validación tecnología de PCR Digital				
SNPs del Cromosoma 4 (Ensayos Taqman y T ^h óptima)				
RS4974667	62.4°C	RS762837	56.4°C	
RS4874668	60°C	RS798750	57.9°C	
RS2236995	60°C	RS612973	60°C	
SNP del Cromosoma X (Ensayos Taqman y T ^h óptima)				
RS1128363		60°C		
2) Ensayos Taqman para abordaje de los Casos 30-34				
Nº de Caso	Enfermedad monogénica	Ensayo Taqman		T ^h
Caso 30 y 31	Síndrome de Mucopolisacaridosis tipo IIIB	♂	NAGLU- Exón 2	60°C
		♀	NAGLU- Exón 6	60°C
Caso 32	Síndrome de Disfunción Múltiple Mitocondrial	♂y♀	NFU1- Exón 7	62.4°C
Caso 33	Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominantes	♀	COL7A1-Exón 61	60°C
Caso 34	Retinosquisis	♀	RS1- Exón 6	64.5°C

Tabla 26. Ensayos Taqman Pre-Design y Custom Taqman Assays (ThermoFisher, Waltham, EEUU) empleados para la validación y el abordaje de casos de enfermedades monogénicas mediante ddPCR así como la T^h de hibridación óptima (T^h) tras la realización del gradiente de Temperaturas para cada ensayo Taqman.

4.3 Interpretación de resultados de ddPCR para DPNI de mutaciones fetales

La interpretación post-análisis de los datos recogidos de la PCR Digital es diferente según el objetivo planteado sea: 1) la detección de alelos paternos en plasma materno o 2) la cuantificación relativa de dosis alélica de alelos maternos en muestras de plasma.

En ambos casos se han considerado dos parámetros óptimos de calidad (POC): 1) muestra con más de 100-200 eventos positivos (todas las réplicas incluidas) y 2) muestra con más de 10,000 eventos totales (positivos y negativos) por réplica.

4.3.1 Detección de alelos paternos en plasma materno

Como protocolo interno, en el diseño del ensayo Taqman específico de la mutación paterna a estudiar, la sonda específica del alelo mutado se marcó con el fluorocromo FAM y la sonda específica del alelo silvestre con el fluorocromo VIC.

En el análisis de datos para determinar el genotipo fetal en los casos de herencia paterna, el software de análisis *QuantSoft* facilita directamente el porcentaje establecido entre los eventos marcados con cada fluorocromo y el número total de eventos cuantificados.

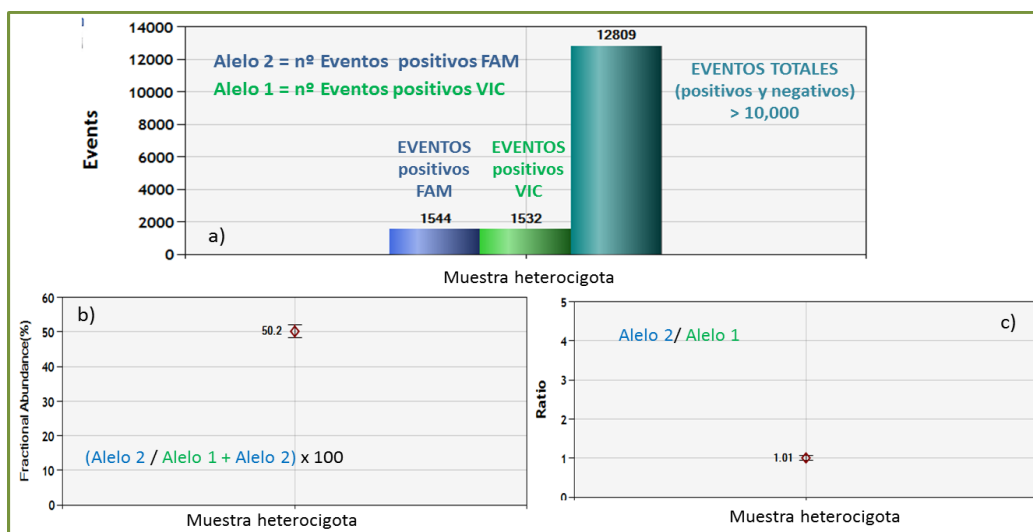


Figura 8. Ejemplo de visualización de resultados obtenidos del software *QuantSoft* para una muestra heterocigota en el estudio de genotipado de mutaciones paternas. a) Visualización del número de eventos positivos marcados en FAM y VIC respecto al total de eventos generados. b) Porcentaje de un alelo (alelo2) respecto al total de eventos positivos (Alelo 1 + Alelo 2) y c) Ratio entre ambos alelos.

4.3.2 Cuantificación de alelos maternos en plasma de gestante

La detección de alelos fetales de origen materno, mediante PCR Digital, implica una cuantificación relativa muy precisa que establezca una situación de equilibrio/desequilibrio entre alelos silvestres y mutantes, consecuencia de la baja contribución fetal al ADN total en el plasma materno. Este mínimo desequilibrio de dosis entre alelos (Relative Mutation Dosage, RMD) será traducido en un valor de Z-score que será asociado a un genotipo fetal (*Figura 7*). La posterior interpretación clínica de este equilibrio/desequilibrio alélico va a depender del modelo de herencia de cada enfermedad.

➤ Cálculo del valor de Z-score

El valor de *Z-score* es una medida que indica las desviaciones estándar a las que está un elemento de la media.

El valor de *Z-score* se calcula a partir de la siguiente formula:

$$z = \frac{(x - \mu)}{\sigma}$$

Donde z es el *Z-score*, x es el valor del elemento, μ es la media poblacional, y σ es la desviación estándar de la población.

Si el feto es heterocigoto:

$$x = N_{FAM} - N_{VIC} \quad N_{FAM} = \text{Nº Eventos positivos marcados con el fluorocromo FAM}$$

$$\mu_x = 0 \quad N_{VIC} = \text{Nº Eventos positivos marcado con el fluorocromo VIC}$$

$$\sigma_x = \sqrt{N_t}$$

De esta manera en valor de *Z-score* es:

$$z = \frac{(x - \mu_x)}{\sigma_x} = \frac{N_{FAM} - N_{VIC}}{\sqrt{N_t}}$$

$$N_t = N_{FAM} + N_{VIC}$$

Los valores de *Z-score* se aplicarán para establecer el genotipo fetal en muestras de plasma materno en el estudio de enfermedades de herencia materna (madre heterocigota).

❖ Enfermedades autosómicas heredadas vía materna

- ✓ *Equilibrio 2/1 (FAM/VIC)*: Valores de *Z-score* comprendidos entre -2 y 2 ($-2 < z < 2$).
- ✓ *Zona Gris*: Valores de *Z-score* comprendidos entre -1.5 y -2 ($-1.5 < z < -2$). Requieren la recogida de nueva muestra.
- ✓ *Zona Gris*: Valores de *Z-score* comprendidos entre 1.5 y 2 ($1.5 < z < 2$). Requieren la recogida de nueva muestra.
- ✓ *Desequilibrio (2>1) FAM>VIC*: cuando el número de eventos marcado en FAM está sobrerrepresentado respecto al número de eventos marcados en VIC. Valores de *Z-score* mayores que 2 (>2) estarán en un Intervalo de Confianza (IC) del 95%.
- ✓ *Desequilibrio (1>2) VIC>FAM*: cuando el número de eventos marcado en VIC está sobrerrepresentado respecto al número de eventos marcados en FAM. Valores de *Z-score* por debajo de -2 (<-2) estarán en un Intervalo de Confianza (IC) del 95%.

❖ **Enfermedades ligadas al cromosoma X**

a) *En caso de feto femenino:* misma interpretación de mutaciones maternas asociadas a enfermedades autosómicas (*apartado anterior*) (*Figura 9*).

b) *En caso de feto masculino:* la presencia de un único cromosoma X implica la existencia de un desequilibrio alélico con sobrerrepresentación del alelo de origen fetal. De esta forma, siempre va a observarse una sobrerrepresentación del alelo marcado en FAM (alelo 2) o del alelo marcado en VIC (alelo 1) según el genotipo fetal (*Figura 9*).

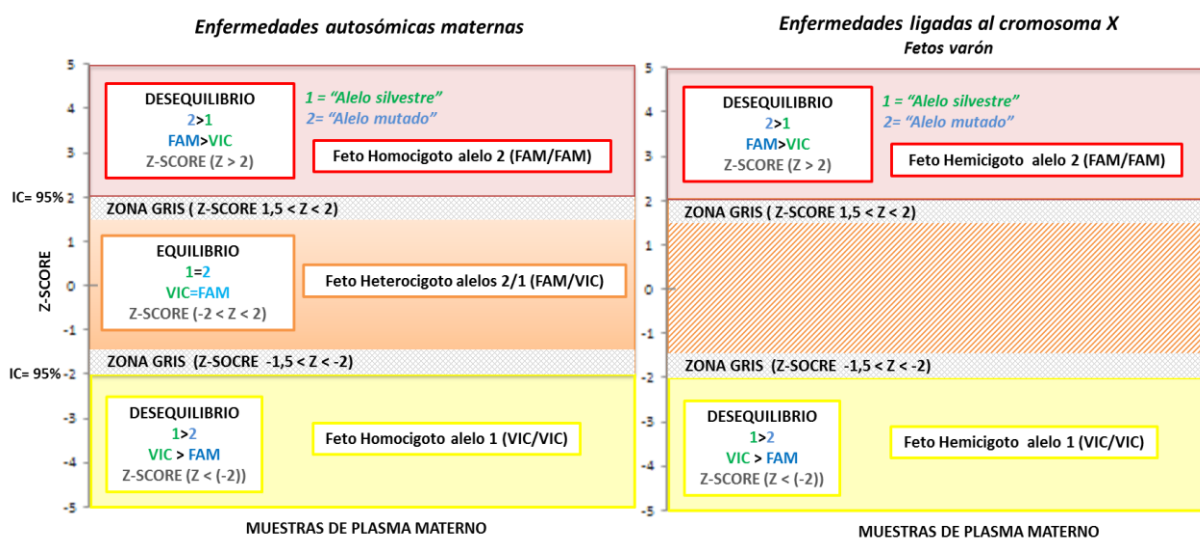


Figura 9. Representación esquemática del equilibrio/desequilibrio entre alelo 1 (FAM) y alelo 2 (VIC). Correlación entre los valores de Z-score y el genotipo fetal en cada uno de los casos. (La Zona Gris (ZG) significa la necesidad de recogida de una nueva muestra).

4.4 Estudio de estimación de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno mediante técnica de PCR Digital

4.4.1 Estudio multiplex genes SRY/GAPDH

En primer lugar se realizó un gradiente de temperaturas, a partir de ADN genómico masculino, para establecer la temperatura de hibridación óptima en este caso para el ensayo en multiplex de SRY/GAPDH, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*Tabla 24, pág 50*). La Tª de h óptima para el ensayo SRY/GAPDH fue 62,4ºC. Los cebadores empleados fueron los mismos que los del (*apartado 2.1, pág 43*).

El porcentaje de ADN fetal detectado a partir del ensayo *SRY/GAPDH* se cuantificó mediante la aplicación de la siguiente fórmula basada en las lecturas FAM/VIC proporcionadas por el software Quantsoft.

$$\left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de eventos marcados en FAM (gen SRY)}}{\text{N}^\circ \text{ de eventos marcados en VIC (gen GAPDH)}} \times 2 \right) \times 100$$

4.4.2 Estudio multiplex genes *RASSF1A/GAPDH*

Se empleó esta estrategia en aquellos casos resultantes de la validación de la técnica de PCR Digital y del estudio de casos de herencia materna en los que tras determinación de sexo fetal se caracterizó a los fetos hembra, con un equilibrio de dosis alélica (mismo genotipo que la madre).

En estos casos, para el estudio del gen *RASSF1A* en ADN fetal, se realizó una digestión enzimática previa con la enzima sensible a metilación BstUI (New England, Biolabs Inc. USA). Se incubaron 43µl de ADN producto de la extracción de la muestra de plasma materno junto con 2µl de la enzima sensible a metilación y 5µl de buffer a 10X a 60°C durante 16 horas para mantener intactas las secuencias hipermetiladas de origen fetal.

Tras la realización del gradiente de temperaturas, a partir de ADN genómico, se estableció que la Tª de hibridación óptima para el ensayo en multiplex de *RASSF1A/GAPDH* era 62,4°C. Los cebadores empleados para el gen *RASSF1A* se muestran en la siguiente (Tabla 27), los cebadores para *GAPDH* son los mismos que en el (apartado 2.1, pág 43).

GEN	Secuencia
RASSF1A	F: 5'- AGCCTGAGCTCATTGAGCTG-3'
	R: 5'- ACCAGCTGCCGTGTGG-3'
	S:5'- 6-FAM CCAACGCGCTGCGCAT-MGB-3'

Tabla 27. Cebadores y sonda para el ensayo en multiplex *RASSF1A/GAPDH* mediante técnica de PCR Digital.

El porcentaje de ADN fetal resultante se cuantificó mediante la aplicación de la siguiente fórmula basada en las lecturas FAM/VIC proporcionadas por el software Quantsoft.

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de eventos marcados en FAM (gen RASSF1A)}}{\text{N}^\circ \text{ de eventos marcados en VIC (gen GAPDH)}} \times 100$$

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Resultados del estudio de DPNI de Enfermedades Monogénicas.

El estudio de enfermedades monogénicas en plasma materno fue realizado en un total de 34 gestaciones (*Tabla 1, págs 30-32*).

El abordaje del estudio se realizó en función del origen de la mutación:

- Casos con abordaje de mutación paterna o “*de novo*”: 29/34 gestaciones.
- Caso con abordaje de mutación paterna y materna: 3/34 gestaciones.
- Casos con abordaje de mutación materna: 2/34 gestaciones.

1.1 Resultados de DPNI de los casos con abordaje de mutación paterna o “*de novo*”

En 29 de las 34 gestaciones se estudió la mutación paterna o “*de novo*” en muestras de plasma materno.

➤ Caso 1: Isoinmunización del antígeno Kell

El estudio preliminar de las diluciones artificiales de ADN positivo para el cambio paterno c.578 C>T en el exón 6 del gen *KEL*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 5%.

No se detectó el cambio paterno en las muestras de plasma materno estudiadas a las 12 y 15 semanas de gestación.

Se realizó el estudio de determinación de sexo fetal y se determinó al feto como hembra. El posterior estudio de genotipado de 6 SNPs del cromosoma X mediante técnica de PCR a Tiempo Real concluyó que el SNP (rs1883796) era informativo en la pareja, siendo la madre homocigota (A/A) y el padre hemicigoto (G) (*apartado 2.2, pág 44*).

Tras este resultado se realizó el estudio en multiplex mediante técnica de minisequenciación del cambio paterno del gen *KEL* (c.578 C>T) y el SNP informativo en el cromosoma X (rs1883796 G>A) en las muestras de plasma materno a las 12 y 15 semanas de gestación para estimar la presencia de ADN fetal en la muestra. Los resultados confirmaron la ausencia del cambio paterno y la presencia del SNP paterno (G) del cromosoma X (rs1883796) como se observa en la (*Figura 10*) confirmando el carácter negativo del feto.

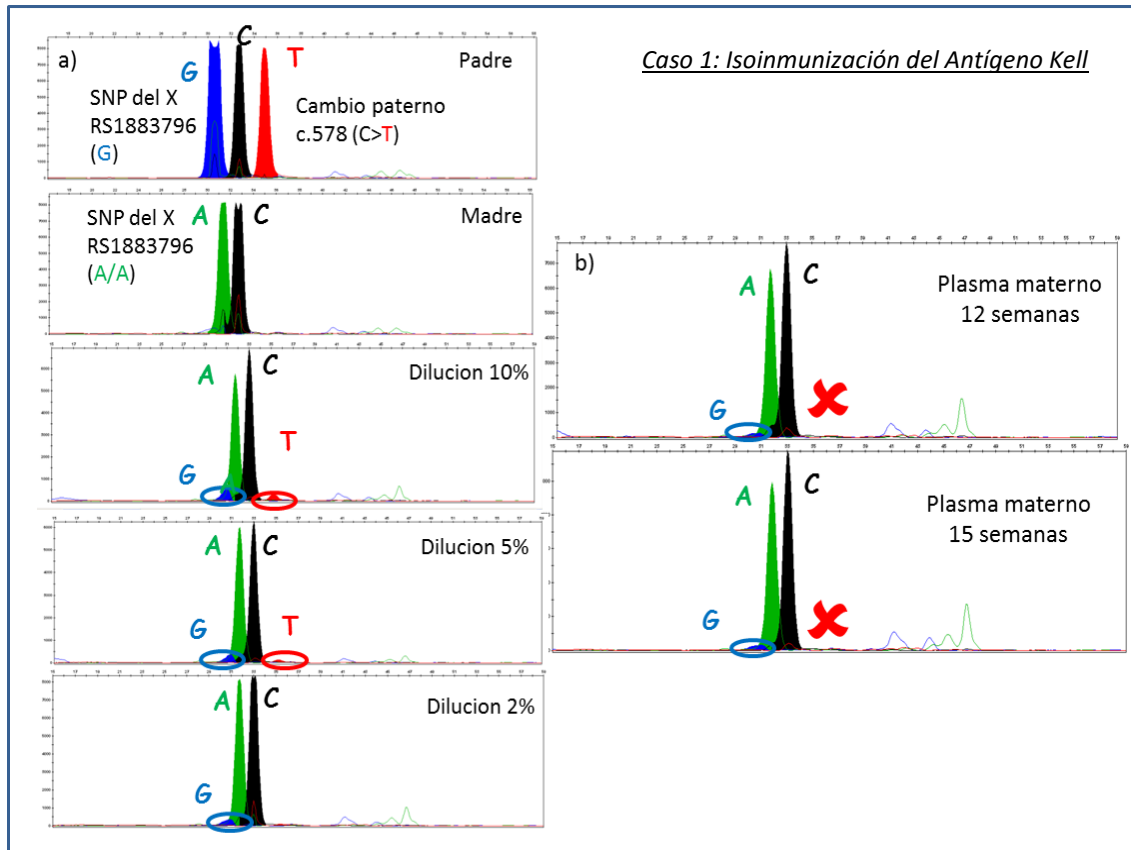


Figura 10. Estudio en multiplex del cambio (c.578 C>T) en el exón 6 del gen KEL y del SNP del cromosoma X (rs1883796 G>A) mediante la técnica de minisequenciación. a) El límite de detección para el cambio c.578 C>T fue la dilución del 5% y para el rs1883796 G>A el 2%. b) El estudio en plasma materno reveló la ausencia del cambio paterno y presencia del SNP del padre a las 12 y 15 semanas de gestación.

No se realizó prueba de DP convencional. El feto a lo largo de la gestación no desarrolló los signos clínicos asociados a la isoinmunización.

➤ Caso 2: Epidermolisis Bullosa Distrófica Dominante

El estudio preliminar de las diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.5381G>A en el exón 61 del gen COL7A1, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 11a).

En la única muestra recogida a las 10 semanas de gestación se detectó la mutación paterna en plasma materno (Figura 11b).

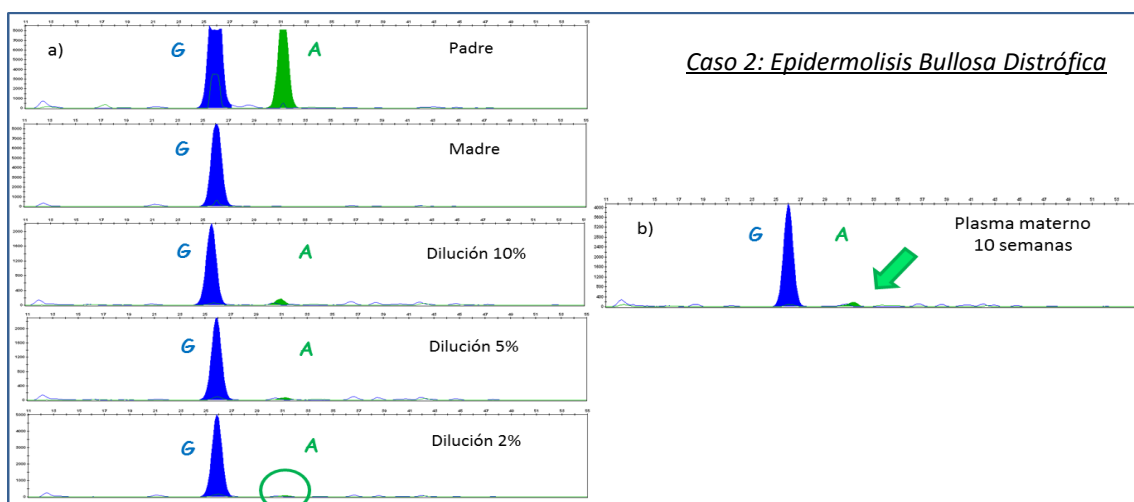


Figura 11. Estudio de la mutación $c.5381G>A$ mediante la técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en la muestra de plasma materno reveló la presencia de la mutación paterna a las 10 semanas de gestación.

Al tratarse de un caso de penetrancia incompleta, la pareja decidió no realizarse DP convencional, el resultado obtenido de DPNI se confirmó al nacimiento.

➤ Caso 3: Síndrome de Rendu Osler Weber

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna $c.1414C>T$ en el exón 11 del gen *ENG*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 12a).

No se detectó la mutación paterna a las 8 semanas pero sí en las muestras de plasma materno recogidas a las 10 y 12 semanas de gestación (Figura 12b).

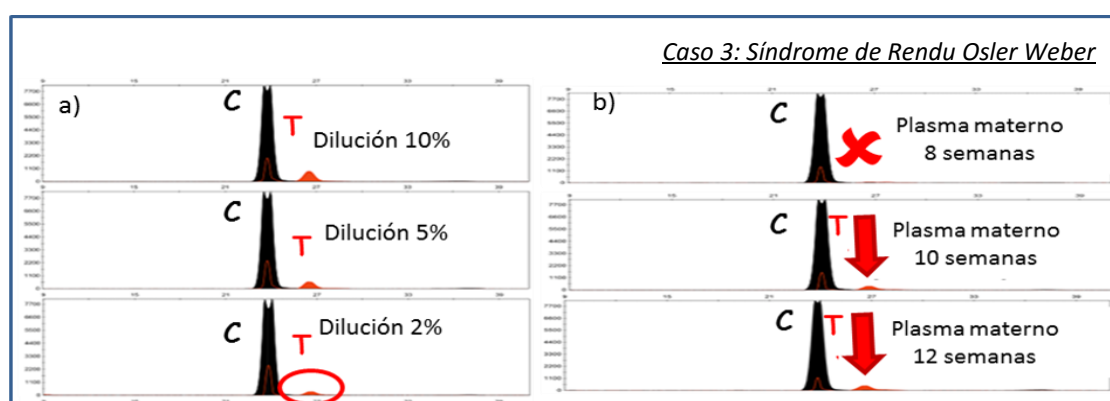


Figura 12. Estudio de la mutación $c.1414C>T$ en el exón 11 del gen *ENG* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en muestra de plasma materno determinó la presencia de la mutación paterna a las 10 y 12 semanas de gestación.

Al tratarse de un feto varón, se estudió el nucleótido del gen *SRY* mediante minisequenciación como método de estimación de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno, revelando su ausencia a las 8 semanas de gestación y detectándose en las muestras de las 10 y 12 semanas.

Los resultados de DPNI obtenidos se confirmaron con los resultantes del estudio prenatal convencional.

➤ Caso 4: Aniridia

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.949 C>T en el exón 3 del gen *PAX6*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (*Figura 13a*).

En la muestra recogida a las 12 semanas de gestación, no se detectó la mutación paterna (*Figura 13b*).

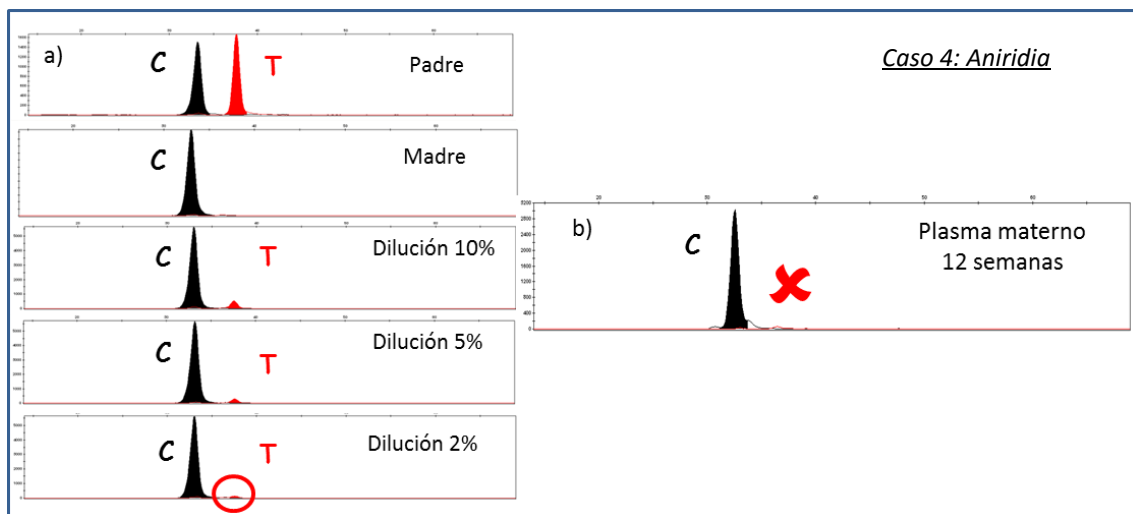


Figura 13. Estudio de la mutación c.949 C>T en el exón 3 del gen *PAX6* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en la muestra de plasma materno a las 12 semanas de gestación reveló la ausencia de la mutación paterna.

No se realizó estimación de la presencia de ADN fetal en la muestra. Los resultados de DPNI obtenidos se confirmaron con los resultantes del estudio prenatal convencional.

➤ Caso 5: Miopatía Nemalínica

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación c.413 T>A en el exón 3 del gen *ACTA1*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 14a).

No se detectó la mutación en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 9 y 11 semanas de gestación (Figura 14b).

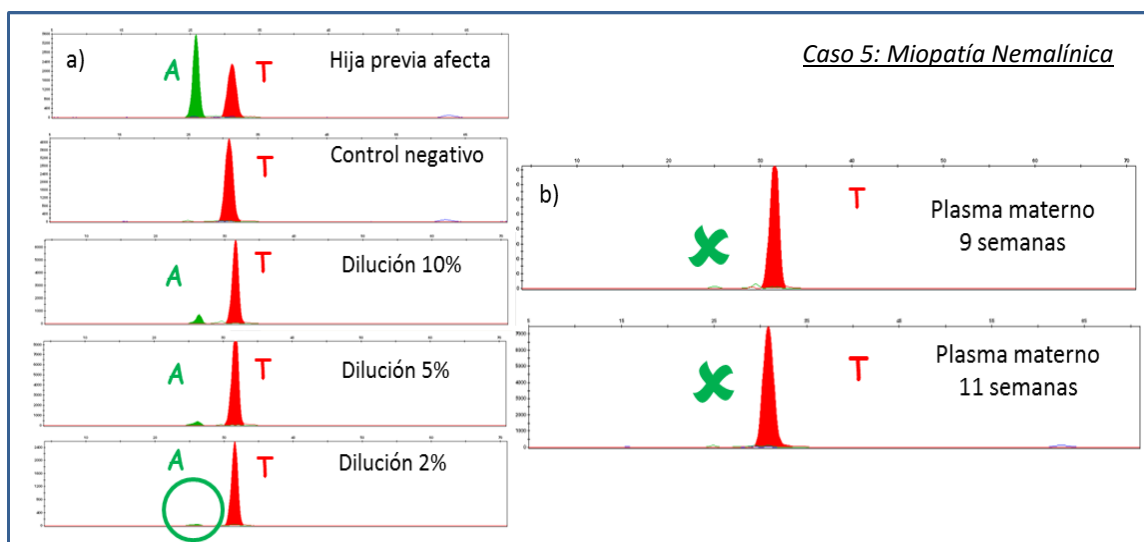


Figura 14. Estudio de la mutación c.413 T>A en el exón 3 del gen *ACTA1* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en las muestras de plasma materno a las 9 y 11 semanas de gestación reveló la ausencia de la mutación.

Dado que se trataba de un feto hembra, se llevó a cabo el genotipado de SNPs del cromosoma X en la pareja (apartado 2.2, pág 44). No hubo ningún SNP informativo en los progenitores y por tanto, no fue posible realizar la estimación de la presencia de ADN fetal mediante esta aproximación.

Los resultados de DPNI obtenidos se confirmaron con los resultantes del estudio prenatal convencional.

➤ Caso 6: Síndrome de Marfan

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.7636 G>A en el exón 62 del gen *FBNI*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 15a).

No se detectó la mutación paterna en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 11 y 13 semanas de gestación (*Figura 15b*).

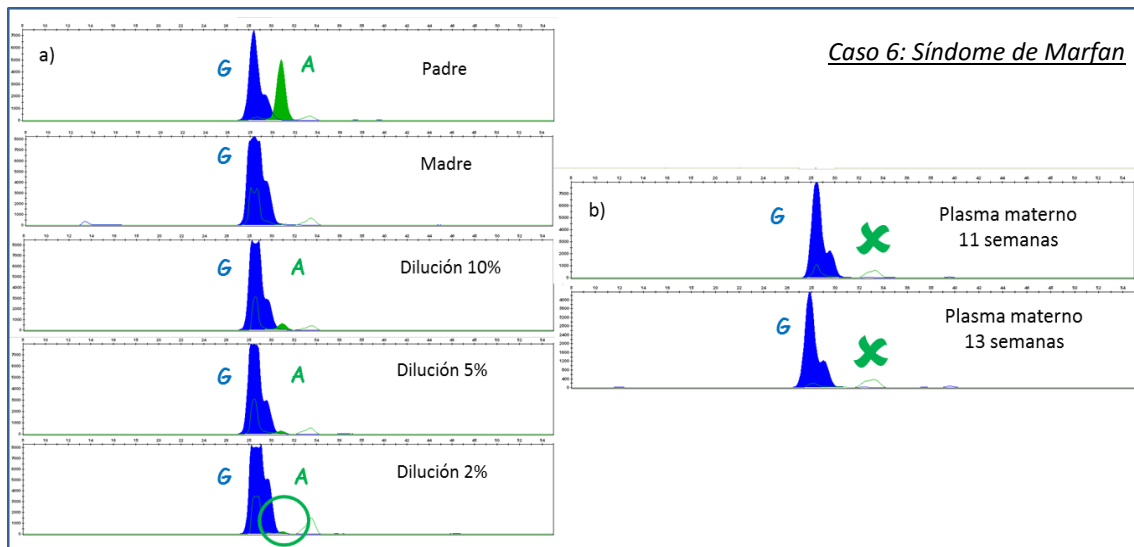


Figura 15. Estudio de la mutación c.7636 G>A en el exón 62 del gen *FBN1* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) No se detectó la mutación paterna en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 11 y 13 semanas de gestación.

En el presente caso se realizó en paralelo un abordaje indirecto a partir de marcadores microsatélite, por técnica de QF-PCR. Tres de los siete marcadores microsatélite flanqueantes al gen *FBN1* estudiados (*Tabla 11, pág 40*) resultaron informativos tras el estudio de genotipado en la pareja; estos fueron el D15S126, MTS2 y MTS4. En plasma materno se estudiaron MTS2 y MTS4, pero no hubo amplificación del alelo fetal de origen paterno en ninguna de las muestras de plasma materno estudiadas.

Dado que se trataba de un feto femenino, se llevó a cabo el genotipado de SNPs del cromosoma X en la pareja (*apartado 2.2, pág 44*). No hubo ningún SNP informativo en los progenitores, por lo tanto, no se pudo estimar la presencia de ADN fetal en la muestra mediante esta aproximación técnica.

Los resultados de DPNI obtenidos se confirmaron con los resultantes del estudio prenatal convencional.

➤ Caso 7: Síndrome de Marfan

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.7776 C>A en el exón 63 del gen *FBN1*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (*Figura 16a*).

Se detectó la mutación paterna en las muestras de plasma materno recogidas a las 8 y 10 semanas de gestación (*Figura 16b*).

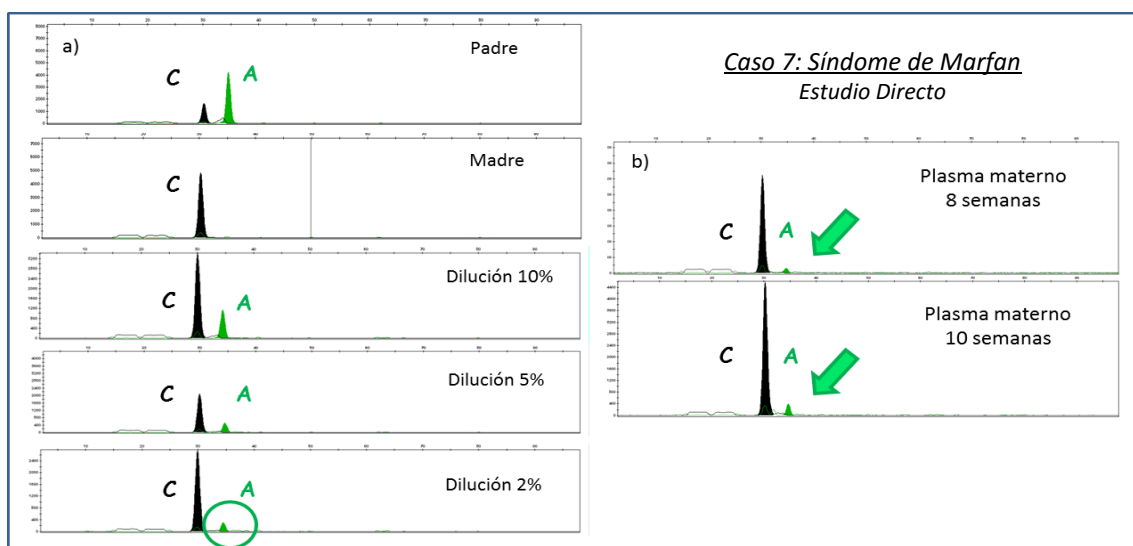


Figura 16. Estudio de la mutación c.7776 C>A en el exón 63 del gen *FBN1* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en las muestras de plasma materno a las 8 y 10 semanas de gestación reveló la presencia de la mutación paterna.

En paralelo se realizó el abordaje indirecto a partir de marcadores microsatélite, por técnica de QF-PCR. Tres de los siete marcadores microsatélite flanqueantes al gen *FBN1* estudiados (*Tabla 11, pág 40*) resultaron informativos tras el estudio de genotipado en la pareja; estos fueron el MTS2, MTS3 y MTS4.

El estudio del marcador MTS2 en muestras de plasma materno a las 8 y 10 semanas de gestación, reveló la presencia del alelo paterno mutado de origen fetal (*Figura 17*) confirmando los resultados previos obtenidos por minisequenciación (*Figura 16*).

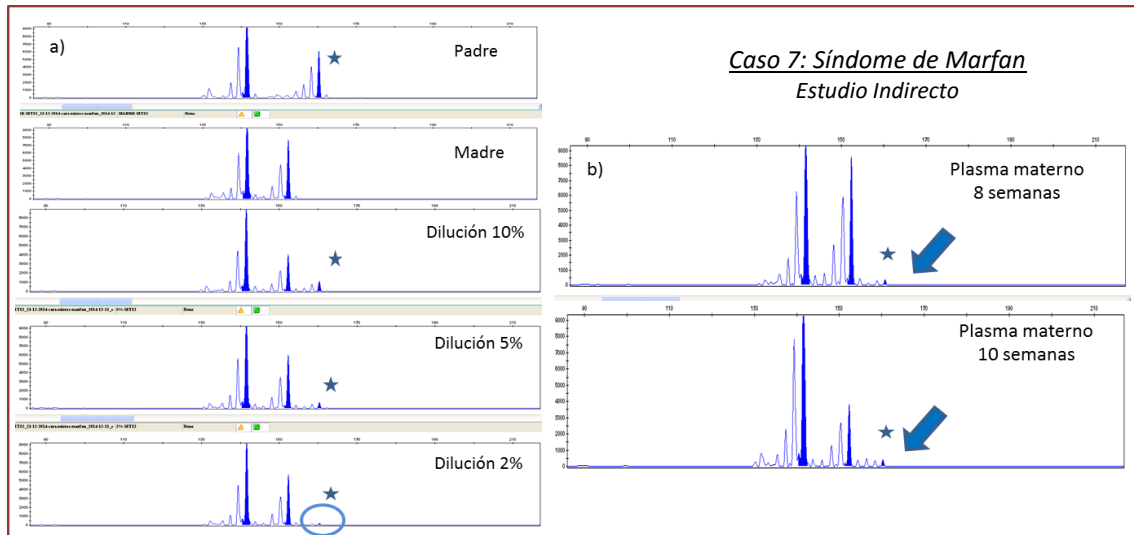


Figura 17. Estudio indirecto del marcador microsatélite *MTS2*. a) El límite de detección de la técnica de QF-PCR fue del 2%. b) Se detectó el alelo mutado de origen paterno en ambas muestras de plasma materno a las 8 y 10 semanas de gestación. (*) alelo paterno mutado.

Tanto el estudio directo de la mutación como el indirecto mediante STRs, revelaron que el feto había heredado la mutación paterna. Los resultados obtenidos de DPNI se confirmaron con los resultantes del estudio prenatal convencional.

➤ Casos 8 al 17: Enfermedad de Huntington

Se estudiaron un total de 10 gestaciones en las que el padre era portador de un alelo expandido asociado a la Enfermedad de Huntington (EH). Los resultados del abordaje directo e indirecto mediante marcadores microsatélite por técnica de QF-PCR de cada caso se muestran en la siguiente tabla (*Tabla 28*).

<i>Casos Enfermedad de Huntington</i>	<i>Abordaje Metodológico</i>	<i>Resultados de DPNI</i>	<i>Resultado DP</i>	<i>DPNI vs DP</i>
<i>Caso 8</i>	Repeticiones CAG	Se detecta expansión	AFECTO	✓
<i>Caso 9</i>	Repeticiones CAG	No detección	AFECTO	ND
	D4S126	No detección		
	I1CAHD	No detección		
<i>Caso 10</i>	Repeticiones CAG	Se detecta alelo sano	NO DP ABORTO	?
	I1CAHD	No detección		
<i>Caso 11</i>	Repeticiones CAG-CGG	Se detecta alelo sano	SANO	✓
	D4S182	Se detecta alelo sano		
<i>Caso 12</i>	Repeticiones CAG	Se detecta expansión	AFECTO	✓
	D4S182	No detección		
<i>Caso 13</i>	Repeticiones CAG	No detección	NO DP ABORTO	ND
	D4S182	No detección		
<i>Caso 14</i>	Repeticiones CAG	Se detecta alelo sano	SANO	✓
	D4S127	Se detecta alelo sano		
<i>Caso 15</i>	Repeticiones CAG	Se detecta alelo sano	AFECTO	FN
	D4S126	No detección		
	I1CAHD	No detección		
<i>Caso 16</i>	Repeticiones CAG	No detección	SANO	ND
	D4S126	No detección		
	I1CAHD	No detección		
	D4S127	No detección		
<i>Caso 17</i>	Repeticiones CAG	No detección	SANO	ND
	D4S126	No detección		
	I1CAHD	No detección		
	D4S127	No detección		

Tabla 28. *Tabla resumen de los resultados obtenidos de Enfermedad de Huntington (casos 8 al 17). Indicando los Resultados de DPNI; Resultados de DP y la comparación entre DPNI y DP convencional. [ND: No Detección; FN: Falso Negativo; ✓=Resultado DPNI coincidente con Resultado de DP; ?: No se realizó DP convencional].*

Se realizó el estudio directo en 9/10 casos mediante el análisis de la región repetida CAG y en 1/10 casos mediante el análisis de la región CAG-CGG. En 2 de los 10 casos se detectó el alelo expandido en muestra de plasma materno; en 3 de 10 se detectó el alelo sano paterno y en los 5 de los 10 casos restantes no hubo detección de ninguno de los dos alelos de origen paterno. Por tanto, la tasa de detección de la técnica analítica QF-PCR para el estudio directo fue del 50%.

El estudio indirecto incluyendo al menos un marcador microsatélite flanqueante al gen *HTT* (Tabla 12, pág 41), se llevó a cabo en 9/10 casos: en 7/9 casos abordados no hubo

detección del alelo paterno de origen fetal; en los 2/9 casos restantes se detectó el alelo sano paterno. Por tanto, la tasa de detección de la técnica analítica QF-PCR para el estudio indirecto fue del 20%.

A continuación se muestra el resultado del estudio directo e indirecto de uno de los casos de Enfermedad de Huntington estudiados en plasma materno (*Caso 14*) (*Figura 18*).

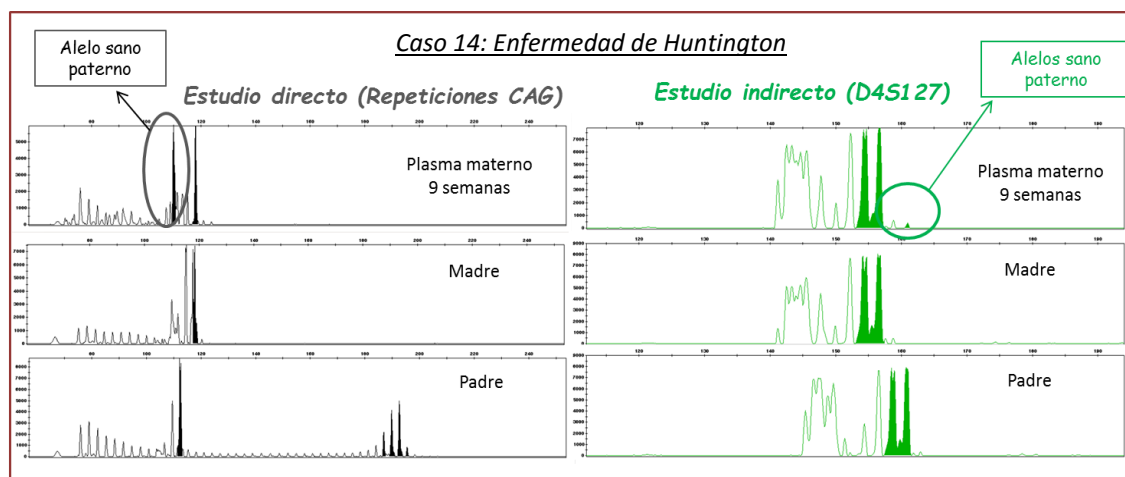


Figura 18. Ejemplo de resultado de Enfermedad de Huntington (*Caso 14*), donde se detectó el alelo sano de origen paterno mediante; a) Estudio Directo por Repeticiones-CAG y b) por Estudio Indirecto del marcador microsatélite *D4S127* en plasma materno a las 9 semanas de gestación.

En 8 de los 10 casos se realizó un Diagnóstico Prenatal convencional. En 4/8 los resultados obtenidos del DPNI y del DP convencional eran coincidentes. En 3/8 no hubo detección de alelo paterno en muestra de plasma materno y 1/8 casos resultó un Falso Negativo ya que se detectó en plasma materno el alelo sano de origen paterno mientras que por DP se diagnosticó al feto como afecto. En los 2 de 10 casos restantes no se realizó DP convencional debido a que las gestantes sufrieron aborto espontáneo. No obstante, el resultado de DPNI de uno de ellos (*caso 10*) se diagnosticó como sano y en el otro (*caso 13*) no hubo detección.

➤ Casos 18 al 22: Acondroplasia

En los cinco casos se realizó el estudio directo mediante minisequenciación de la mutación más frecuente asociada a la enfermedad de Acondroplasia (c.1138 G>A) en el exón 10 del gen *FGFR3*, para conocer el estatus de los fetos respecto a dicha mutación.

En los casos 18, 20 y 21 se detectó la mutación c.1138 G>A en plasma materno a las 25, 27 y 25 semanas de gestación respectivamente. En los casos 19 y 22 (26 semanas de gestación) no se detectó la mutación asociada a dicha enfermedad (*Figura 19*).

La determinación del sexo fetal realizado en cada caso, con el fin de estimar la presencia de ADN fetal, reveló que en los casos 18,19, 20 y 21 el feto era varón, por ello en estos casos se realizó la estimación de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno a partir del estudio del nucleótido del gen *SRY* mediante técnica de minisequenciación. En todos los casos se detectó en nucleótido del gen *SRY* en muestra de plasma materno, confirmando la presencia de ADN fetal en la muestra y el sexo varón de los fetos. El caso 22, resultó un feto hembra y no se estimó la presencia de ADN fetal.

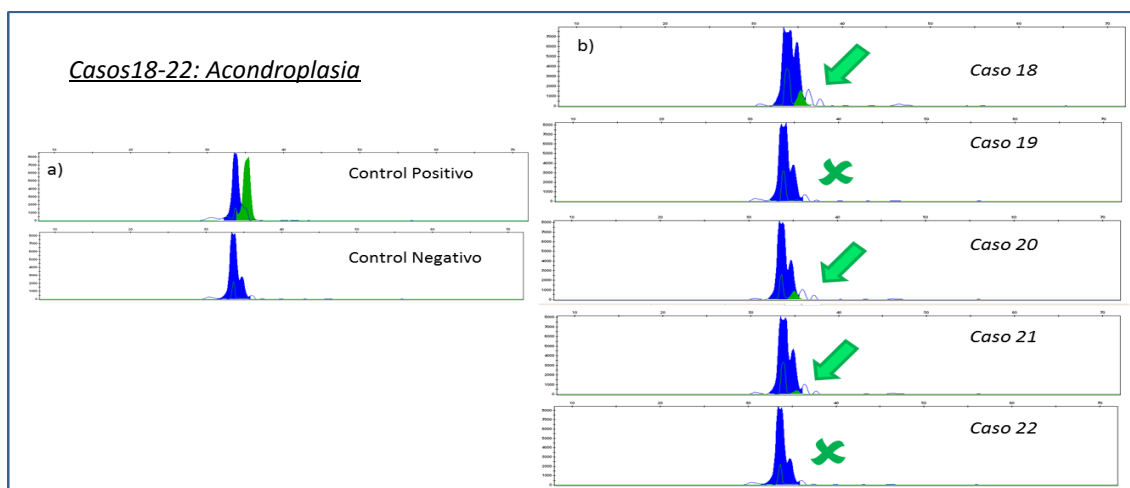


Figura 19. Estudio de la mutación más frecuente c.1138 G>A en el exón 10 del gen *FGFR3* asociada a Acondroplasia en cinco gestaciones mediante técnica de minisequenciación. a) Controles positivo y negativo para la mutación y b) Muestras de plasma materno de los cinco casos estudiados.

El resultado de DPNI de los casos 18 y 20 se comparó con los resultados de DP convencional. En el caso 19 y 21 la pareja decidió no realizar DP siendo los resultados de DPNI confirmados al nacimiento. En el caso 21 que se trataba de un embarazo gemelar, al nacimiento se comprobó que uno de los fetos resultó afecto y el otro feto sano. El caso 22 derivó en un aborto espontáneo y no fue posible estudiar los restos abortivos.

➤ Caso 23: Síndrome de Bartter

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.1783 C>T en el exón 16 del gen *CLCNKB*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (*Figura 20a*).

No se detectó la mutación paterna en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 8, 10 y 12 semanas de gestación (*Figura 20b*).

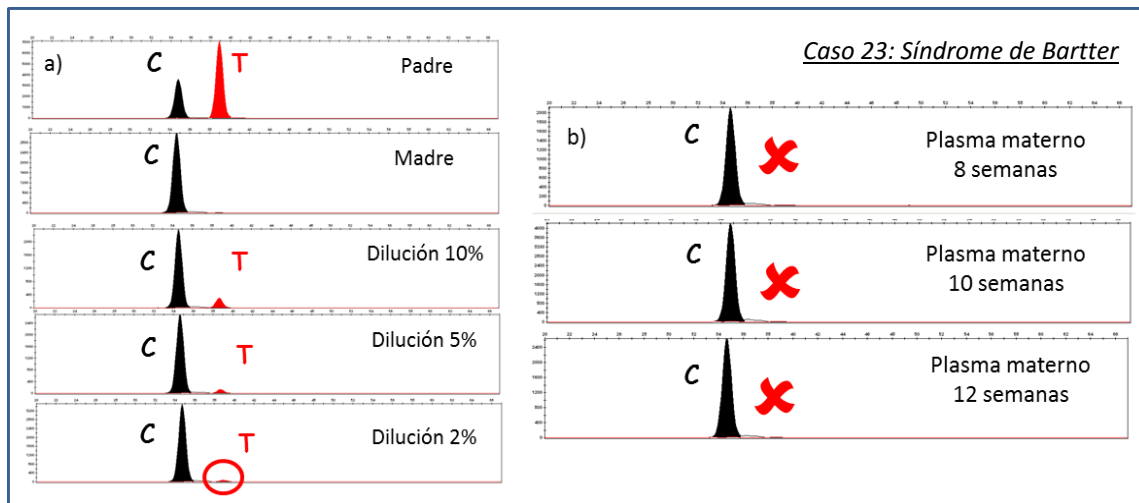


Figura 20. Estudio de la mutación $c.1783C>T$ en el exón 16 del gen *CLCNKB* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) La ausencia de la mutación en las tres muestras de plasma materno se asoció a un feto no portador de la mutación paterna.

Al tratarse de un feto varón, se realizó la estimación de la presencia de ADN fetal mediante el estudio del nucleótido del gen *SRY* mediante la técnica de minisequenciación. Se detectó el gen *SRY* a las 8, 10 y 12 semanas de gestación confirmando la presencia de ADN fetal en las muestras de plasma materno (*Figura 21*).

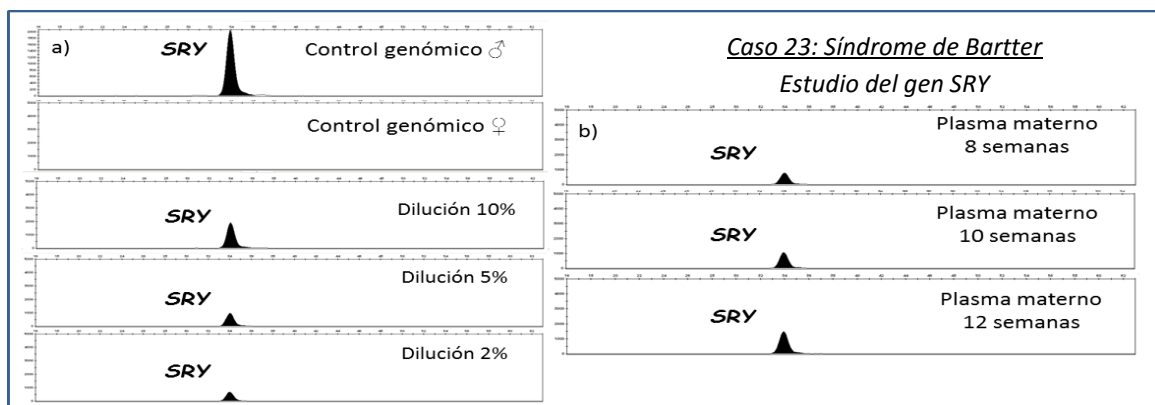


Figura 21. Estudio del nucleótido del gen *SRY* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) El estudio en plasma materno reveló la presencia del gen *SRY* en las muestras de plasma materno estudiadas a las 8, 10 y 12 semanas de gestación.

El DP convencional realizado a las 12 semanas confirmó que se trataba de un feto no portador de la mutación paterna y reveló su carácter de portador de la mutación materna.

➤ Caso 24: Síndrome de Ellis Van Creveld

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.2029C>T en el exón 1 del gen *EVC2*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 5% (Figura 22a).

No se detectó la mutación paterna en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 9 y 12 semanas de gestación (Figura 22b).

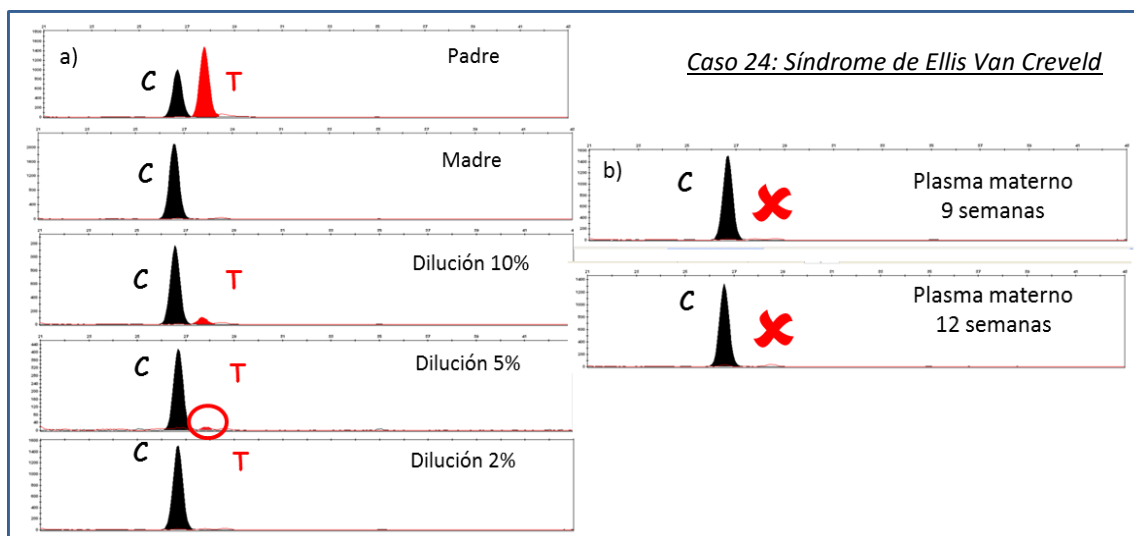


Figura 22. Estudio de la mutación c.2029 C>T en el exón 13 del gen *EVC2* mediante técnica de minisequenciación. a) El límite de detección fue la dilución del 5%. b) La ausencia de la mutación en las dos muestras de plasma materno indica que el feto no era portador de la mutación paterna.

La determinación de sexo fetal reveló que se trataba de un feto varón. Se estudió un nucleótido del gen *SRY* como control de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma materno, mediante técnica de minisequenciación. Se detectó el gen *SRY* a las 9 y 12 semanas de gestación.

El DP convencional realizado a las 12 semanas confirmó que se trataba de un feto no portador de la mutación paterna y reveló su carácter de portador de la mutación materna.

➤ Caso 25: Hipoplasia de cartilago-pelo

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna g.236 A>G en el exón 1 del gen *RMRP*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2%.

No se detectó la mutación paterna en ninguna de las muestras de plasma materno estudiadas a las 8, 10 y 12 semanas de gestación.

Se realizó el estudio de determinación de sexo fetal y se determinó al feto como varón. Se estudió un nucleótido del gen *SRY* en multiplex con la mutación objeto de estudio como control de la presencia de ADN fetal en muestra de plasma mediante técnica de minisequenciación. Los resultados confirmaron la ausencia de mutación paterna y revelaron la presencia del nucleótido del gen *SRY* (Figura 23).

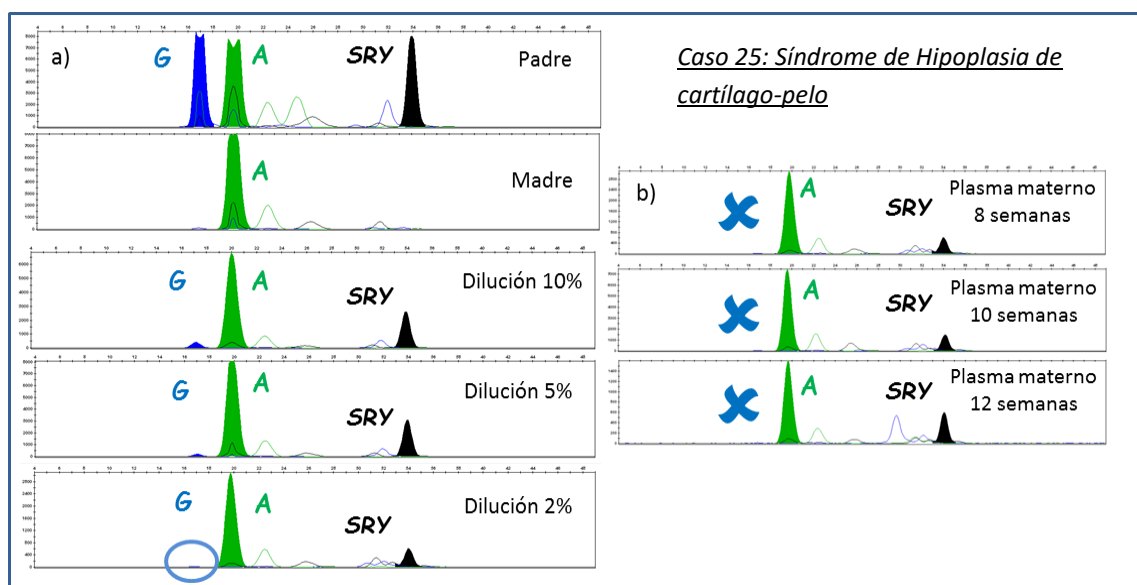


Figura 23. Estudio en multiplex de la mutación paterna g.236 A>G en el exón 1 del gen RMRP y el gen *SRY* mediante minisequenciación. a) El límite de detección en ambos casos fue del 2 %. b) En todas las muestras de plasma materno recogidas a las 8, 10 y 12 semanas de gestación se observó la ausencia de mutación paterna y la presencia del gen *SRY* confirmando la presencia de ADN fetal.

El DP convencional realizado a las 12 semanas confirmó los resultados de DPNI respecto a la mutación paterna y reveló que el feto era sano, portador de la mutación materna.

➤ Caso 26: Fibrosis Quística

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.3484C>T en el exón 22 del gen *CFTR*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 24a).

Se detectó la mutación paterna en las muestras de plasma materno estudiadas a las 7 y 10 semanas de gestación revelando el carácter portador del feto para la mutación paterna (Figura 24b).

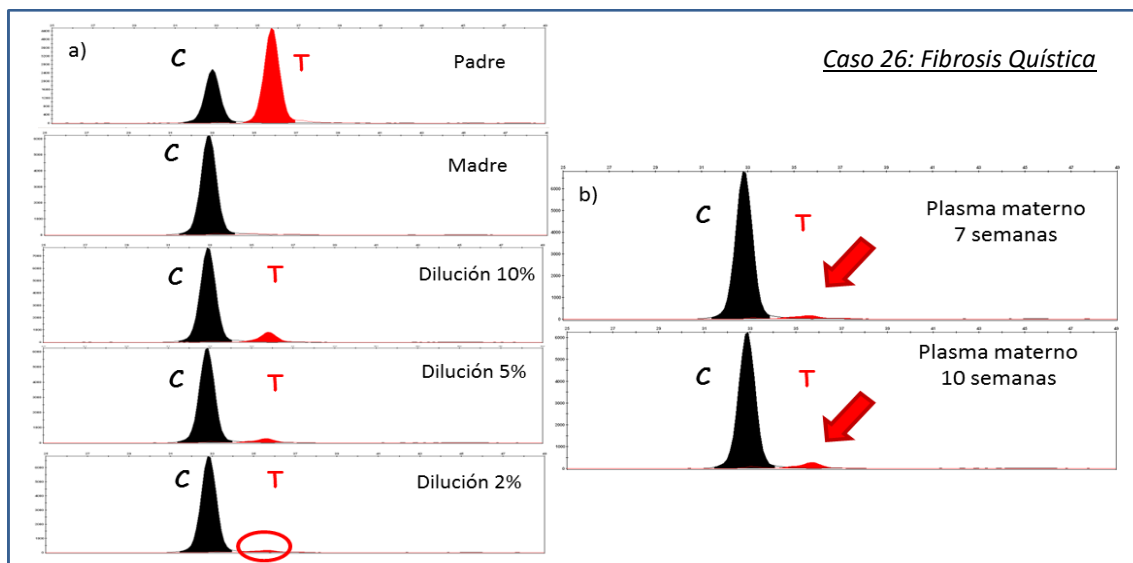


Figura 24. Resultados obtenidos por minisequenciación en el estudio de la mutación c.3484 C>T en el exón 22 del gen CFTR. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) La presencia de la mutación en las dos muestras de plasma materno reveló que el feto era portador de la mutación paterna.

En paralelo se realizó el estudio indirecto mediante técnica de QF-PCR para los marcadores flanqueantes al gen CFTR (Tabla 13, pág 41). De todos ellos uno resultó informativo (IVS17bCA) y dos semi-informativos (D7S655 y D7S2847).

El estudio indirecto de estos 3 STRs en muestras de plasma materno no fue concluyente debido a que ninguno de los alelos de origen paterno fue detectado.

Los resultados de DPNI fueron confirmados mediante DP convencional y revelaron que el feto era sano, portador de la mutación paterna.

➤ Caso 27: Fibrosis Quística

En una segunda gestación del caso anterior (caso 26), se realizó estudio directo de la mutación paterna en muestras de plasma materno recogidas a las 8, 10 y 11 semanas de gestación. Los resultados obtenidos de la técnica de minisequenciación mostraron un artefacto en la región donde amplificaba la mutación paterna que dificultaba la interpretación de resultados.

En paralelo se realizó el estudio indirecto de los marcadores IVS17bCA, D7S655 y D7S2847. Los resultados obtenidos del estudio indirecto tampoco fueron concluyentes.

No fue posible emitir un resultado de DPNI respecto a la mutación paterna en plasma materno. El estudio en muestra de vellosidad corial reveló un feto sano no portador de la mutación paterna ni de la mutación materna.

➤ Caso 28: Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.2074 C>T en el exón 14 del gen *LAMC2*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 25a).

Se detectó la mutación paterna en todas las muestras de plasma materno recogidas a las 8, 10 y 12 semanas de gestación (Figura 25b)

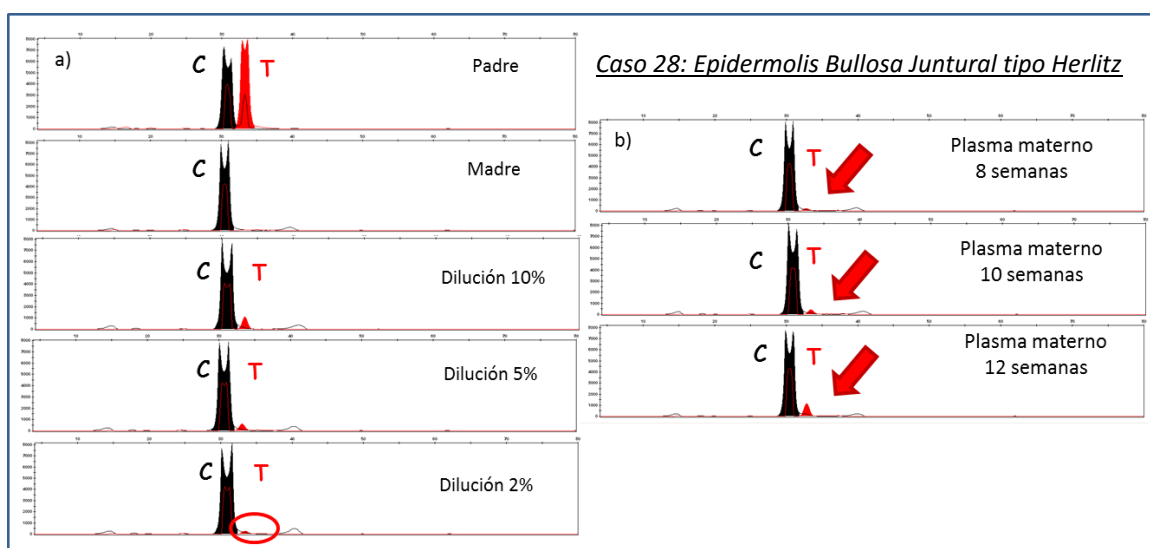


Figura 25. Resultados obtenidos por minisequenciación en el estudio de la mutación c.2074 C>T en el exón 14 del gen *LAMC2*. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) La presencia de la mutación en las tres muestras de plasma materno reveló que el feto era portador de la mutación paterna.

El estudio de DP convencional confirmó los resultados de DPNI y reveló que el feto era afecto, ya que además había heredado la mutación materna.

➤ Caso 29: Defecto congénito de Glicosilación tipo 1A

El estudio preliminar de la serie de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación paterna c.710 C>T en el exón 8 del gen *PMM2*, en ADN negativo, reveló que el límite de detección de la técnica de minisequenciación era del 2% (Figura 26a).

No se detectó la mutación paterna a las 7 semanas de gestación pero sí en las muestras de plasma materno recogidas a las 9 y 11 semanas (*Figura 26b*).

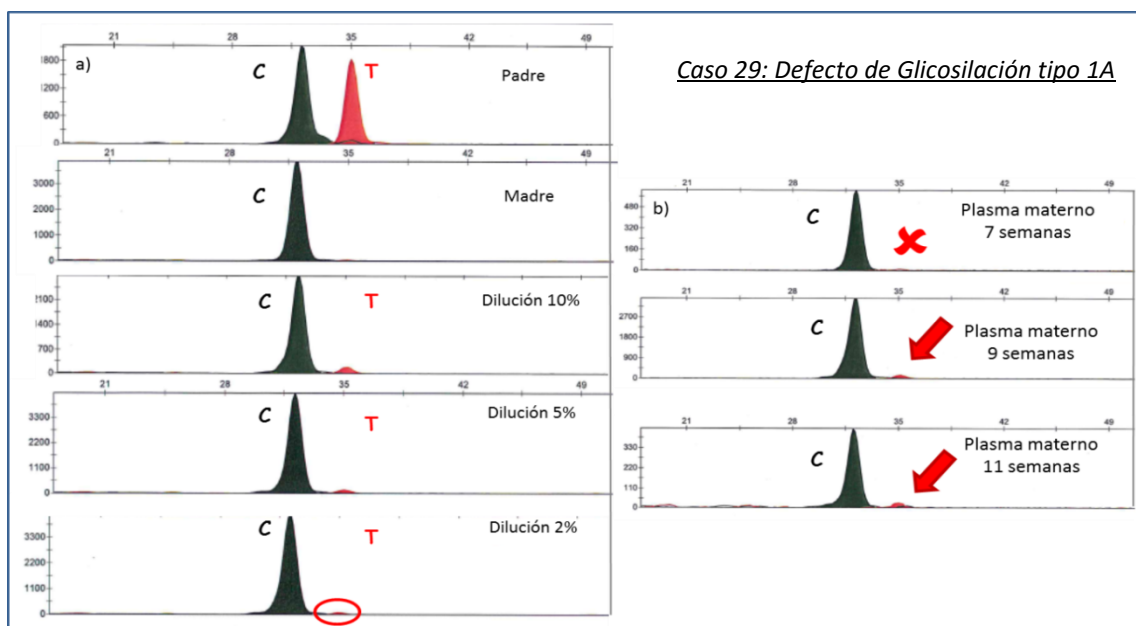


Figura 26. Resultados obtenidos por minisequenciación en el estudio de la mutación c.710 C>T en el exón 8 del gen PMM2 en plasma materno. a) El límite de detección fue la dilución del 2%. b) La presencia de la mutación paterna en muestra de plasma materno a las 9 y 11 semanas de gestación reveló que el feto era portador de la mutación paterna.

El Diagnóstico Prenatal convencional confirmó el resultado de DPNI obtenido y reveló que el feto era sano, portador de la mutación paterna.

1.2 Resultados de DPNI de casos con abordaje de mutación paterna y materna.

En este apartado se muestran los resultados de tres gestaciones; dos de ellas (casos 30 y 31) con un patrón de herencia autosómico recesivo donde ambos progenitores eran portadores de mutaciones diferentes en el mismo gen y una tercera gestación (caso 32) con un patrón de herencia autosómico recesivo donde ambos progenitores eran portadores de la misma mutación responsable de la enfermedad.

➤ Caso 30: Mucopolisacaridosis tipo IIIB

El abordaje de la mutación paterna c.503 G>A en el exón 2 del gen *NAGLU* responsable del Síndrome de San Filippo o Mucopolisacaridosis tipo IIIB se llevó a cabo mediante tres tecnologías; a) mediante técnica de minisequenciación, b) técnica de QF-PCR y c) técnica de PCR Digital.

Los resultados del estudio de la mutación paterna c.503 G>A mediante técnica de minisequenciación revelaron que el límite de detección de la mutación era del 10%. Se detectó la mutación paterna en ambas muestras de plasma materno recogidas a las 10 y 12 semanas de gestación (*Figura 27a*).

En paralelo se realizó el estudio indirecto mediante técnica de QF-PCR para los marcadores flanqueantes al gen *NAGLU* (*Tabla 14, pág 41*). De todos ellos dos resultaron informativo (D17S1787) y (D17S792). El resultado del estudio indirecto a partir del marcador microsatélite informativo D17S1787 reveló que el límite de detección de la técnica era del 2%. En ambas muestras de plasma materno se detectó en alelo mutado paterno (*Figura 27b*).

Finalmente en cuanto al resultado obtenido mediante tecnología de PCR Digital de la mutación c.503 G>A, se detectó un 9.3% del alelo mutado de origen paterno en la muestra de plasma materno recogida a las 10 semanas de gestación y un 16.6% del alelo mutado de origen paterno en la muestra recogida a las 12 semanas de gestación (*Figura 27c*).

Caso 30: Mucopolisacaridosis tipo IIIB (Mutación Paterna)

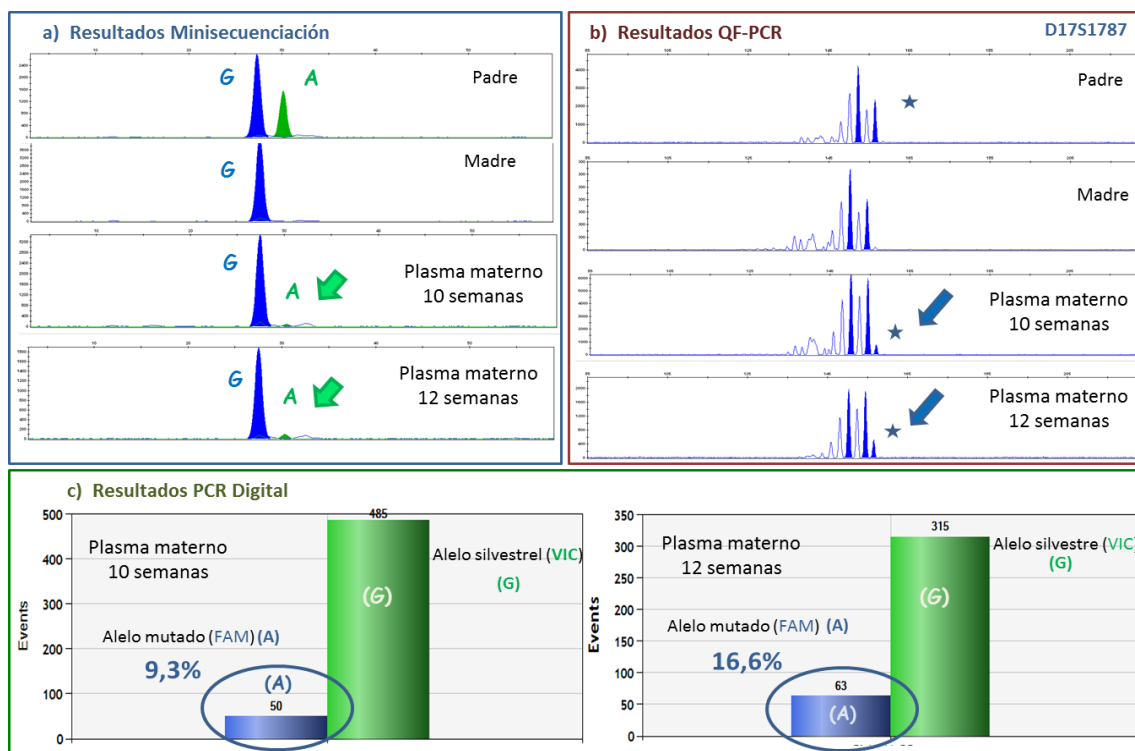


Figura 27. Resultados obtenidos del estudio de la mutación paterna c.503 G>A en el exón 2 del gen *NAGLU* en plasma materno mediante: a) técnica de minisequenciación donde se detectó la mutación paterna a las 10 y 12 semanas de gestación; b) QF-PCR donde se detectó el alelo paterno mutado en ambas muestras de plasma materno (★ alelo paterno mutado) y c) PCR Digital que reveló un porcentaje de mutación paterna del 9,3% a las 10 semanas de gestación y 16,6% a las 12 semanas.

El abordaje de la mutación de origen materno c.1696 C>T fue llevado a cabo mediante la técnica de PCR Digital. Los resultados del valor de Z-score resultante en la muestra de plasma materno de 10 semanas era de (0.37), a las 12 semanas (-0.19) y el valor combinado de ambas muestras (0.16). La determinación de equilibrio alélico observado en ambas muestras de plasma materno determinó al feto como heterocigoto (C/T) y por tanto portador de la mutación materna (*Figura 28*).

Caso 30: Mucopolisacaridosis tipo IIIB (Mutación Materna)

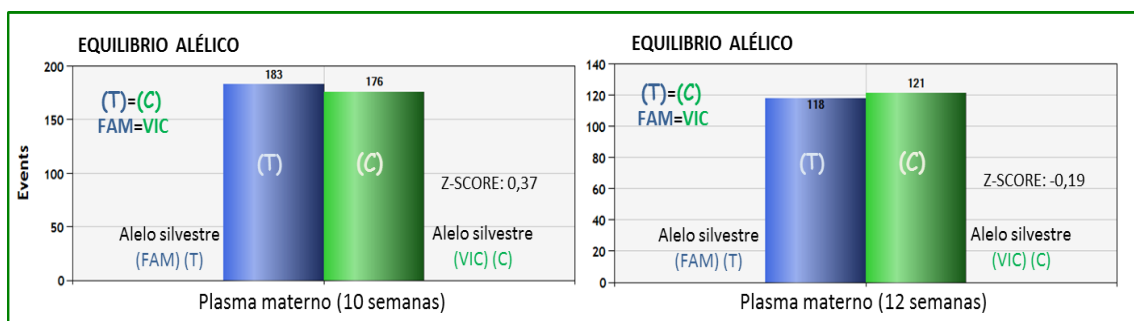


Figura 28. Resultado del estudio de la mutación materna c.1696 C>T mediante técnica de PCR Digital reveló un equilibrio alélico en ambas muestras de plasma materno determinando al feto como portador de la mutación materna.

Finalmente, el feto se diagnosticó como afecto de la enfermedad de Mucopolisacaridosis IIIB, al revelar la presencia de ambas mutaciones.

En este caso, no se estimó de presencia de ADN fetal en la muestra ya que la detección de la mutación paterna en plasma materno confirmaba indirectamente la existencia de ADN fetal.

Los resultados obtenidos de DPNI fueron confirmados mediante resultado de DP convencional, determinando al feto como afecto del Síndrome de San Filippo.

➤ Caso 31: Mucopolisacaridosis tipo IIIB

Este caso corresponde a una segunda gestación de la misma pareja presentada en el caso anterior (caso 30), por tanto el abordaje metodológico llevado a cabo fue el mismo.

En las muestras de plasma materno recogidas a las 8,10 y 12 semanas de gestación no se detectó la mutación paterna mediante técnica de minisequenciación (*Figura 29a*).

El resultado del estudio indirecto a partir del marcador microsatélite informativo D17S792 reveló que el límite de detección de la técnica era del 2%. En todas las muestras estudiadas de plasma materno se observó la presencia del alelo sano de origen paterno (Figura 29b).

Los resultados de PCR digital muestran una ausencia de eventos marcados con el fluorocromo FAM (A) (alelo mutado) en las muestras recogidas a las 8,10 y 12 semanas de gestación (Figura 29c).

Caso 31: Mucopolisacaridosis tipo IIIB (Mutación Paterna)

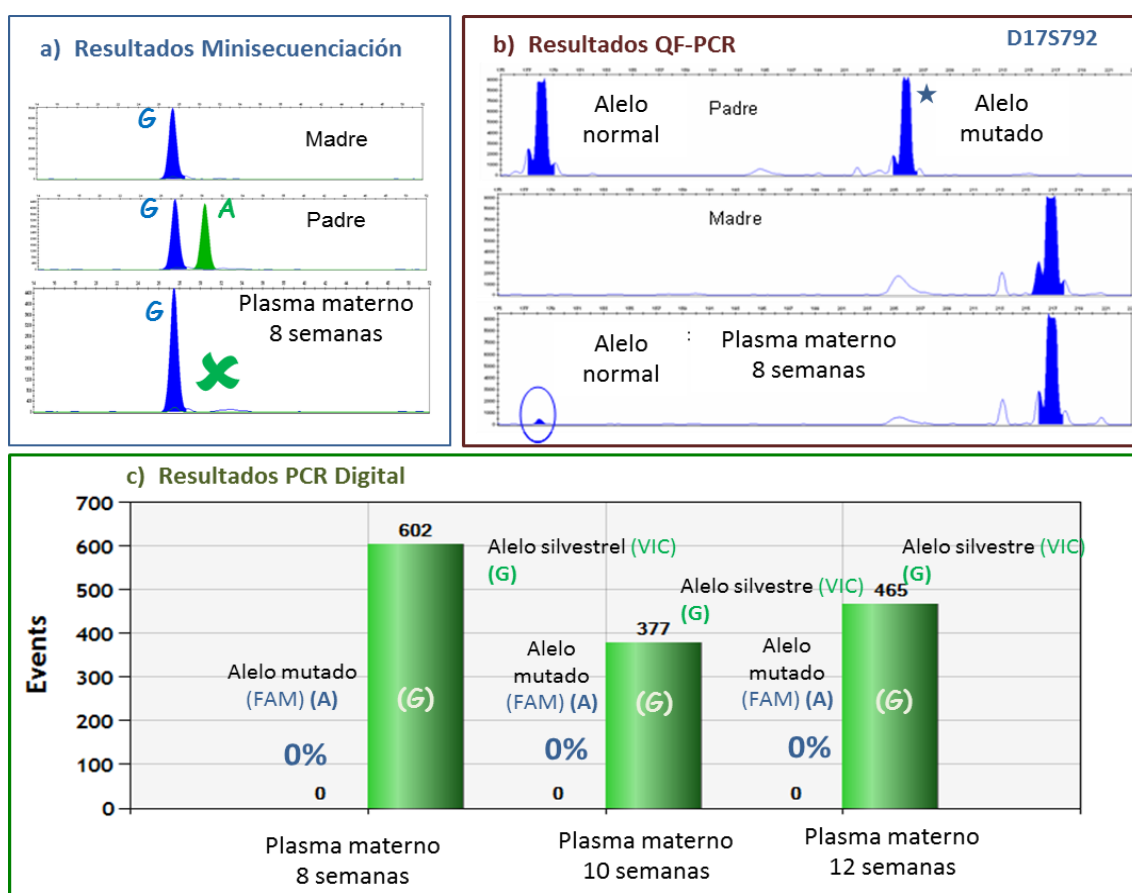


Figura 29. Resultados obtenidos del estudio de la mutación paterna c.503 G>A en el exón 2 del gen NAGLU en plasma materno mediante: a) técnica de minisequenciación donde no se detectó la mutación paterna a las 8, 10 ni 12 semanas de gestación; b) QF-PCR donde se detectó el alelo paterno normal a partir del marcador microsatélite D17S792 en muestra de plasma materno y c) PCR Digital que reveló un porcentaje de mutación paterna del 0% a las 8, 10 y 12 semanas de gestación.

El abordaje de la mutación materna (c.1696 C>T) mediante técnica de PCR Digital reveló que los valores de Z-score obtenidos en la muestra de plasma materno recogida a las 8

semanas era (-2.05) en la de 10 semanas (-2.22) en la de 12 semanas (-3.81) y el valor combinado de las tres muestras de Z-score (-4.6). Valores de Z-score menores de -2 (<-2) muestran un desequilibrio alélico, consecuencia de la contribución fetal a la muestra, mostrando una sobrerrepresentación de VIC (C) respecto a FAM (T), y situando por tanto al feto en el rango de homocigoto normal (C/C). Por tanto, se determinó al feto como no portador de la mutación materna (*Figura 30*).

Caso 31: Mucopolisacaridosis tipo IIIB (Mutación Materna)

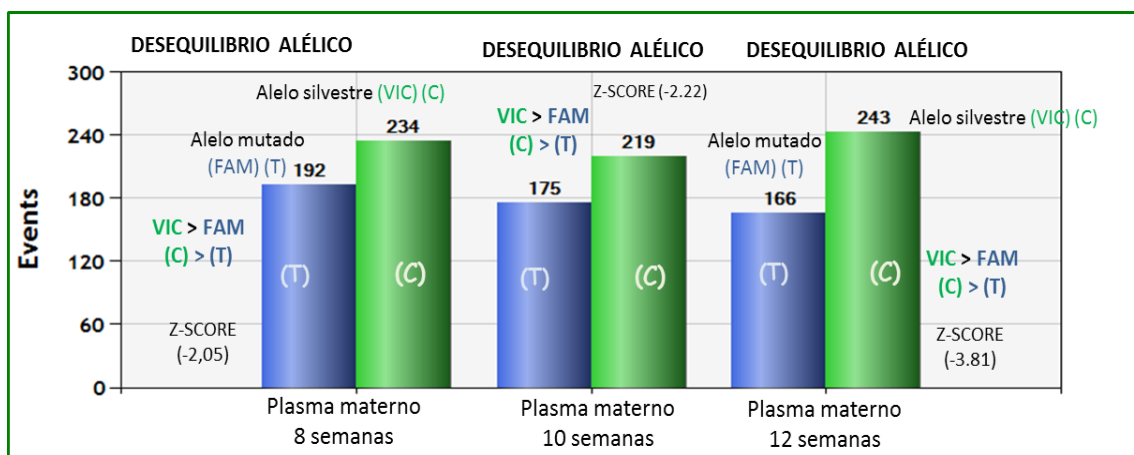


Figura 30. El resultado del estudio de la mutación materna c.1696 C>T mediante técnica de PCR Digital reveló un desequilibrio alélico en todas las muestras de plasma materno con una sobrerrepresentación del alelo normal (C) (VIC) respecto al alelo mutado (T) (FAM) (C>T) determinando al feto como no portador de la mutación materna.

El estudio en muestra de vellosidad corial reveló un feto sano, no portador de la mutación paterna ni materna.

➤ Caso 32: Dísfunción Múltiple Mitocondrial

Al tratarse de un caso de herencia recesiva donde los progenitores eran portadores de la misma mutación c.622 G>T en el exón 7 del gen *NFU1*, se requirió de un abordaje mediante análisis de cuantificación de dosis alélica (RMD) para determinar el genotipo fetal a partir de la tecnología de PCR Digital.

En la muestra de plasma materno recogida a las 10 semanas de gestación se determinó un valor de Z-score de (-0.25) y a las 11 semanas (0.49) el valor combinado de Z-score fue (0.32). Por tanto, está en el rango de feto heterocigoto (G/T) relevando un feto con el mismo genotipo que la madre (equilibrio alélico) y por tanto portador de la mutación c.622 G>T pero no afecto (*Figura 31*).

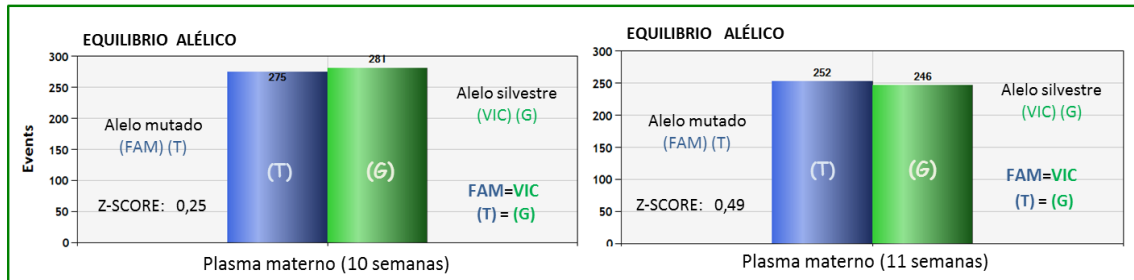
Caso 32: DÍSFUNCIÓN MÚLTIPLE MITOCONDRIAL

Figura 31. Resultado del estudio de la mutación paterna y materna c.622 G>T mediante técnica de PCR Digital reveló un equilibrio alélico en ambas muestras de plasma materno (G=T) (VIC=FAM) determinando al feto como portador de la mutación responsable de Disfunción Múltiple Mitocondrial.

El equilibrio alélico observado, recomendaba la estimación de la presencia de ADN fetal. Esto se llevó a cabo mediante el estudio en multiplex de los genes *RASSF1A/GAPDH*. El porcentaje de ADN fetal a las 10 semanas era de 2.5% y a las 11 semanas 3.4% (Tabla 29). El estudio en muestra de vellosidad corial determinó que era un feto sano portador en heterocigosis de la mutación responsable del Síndrome de Disfunción Múltiple mitocondrial.

1.3 Resultados de DPNI de casos con abordaje de mutación materna.

➤ Caso 33: Epidermolisis Bullosa Distrófica

Pareja en la que la gestante era portadora de la mutación c.5381 G>A responsable de la enfermedad de Epidermolisis Bullosa Distrófica. El abordaje de la mutación materna se llevó a cabo mediante técnica de PCR Digital.

En la muestra de plasma materno recogida a las 20 semanas de gestación se determinó un valor de Z-score de (-1.4) por tanto en el rango de feto heterocigoto (A = G) (FAM=VIC) determinando al feto como afecto de Epidermosis Bullosa Distrófica (Figura 32).

Caso 33: Epidermolisis Bullosa Distrófica

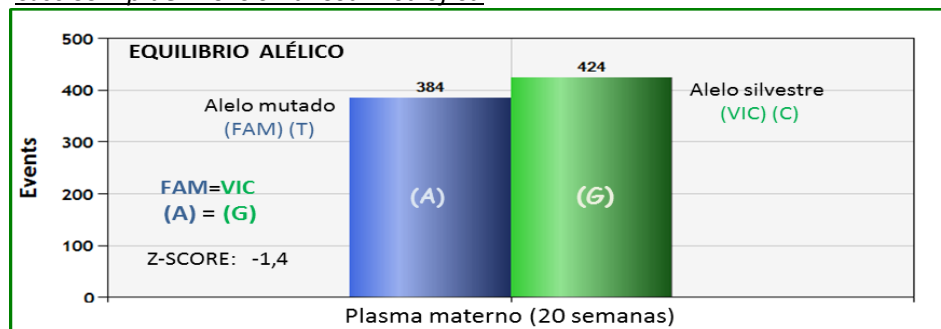


Figura 32. Resultado del estudio de la mutación materna c.5381 G>A mediante técnica de PCR Digital reveló un equilibrio alélico en ambas muestras de plasma materno (VIC>FAM) determinando al feto como portador de la mutación responsable de Epidermolisis Bullosa Distrófica.

Dado que el feto presentaba mismo genotipo que la madre era recomendable realizar una estrategia de estimación de la presencia de ADN fetal. Se trataba de un feto varón, por tanto se llevó a cabo es estudio en Multiplex de *SRY/GAPDH* y reveló un porcentaje de ADN fetal en la muestra del 9.24% (Tabla 29). El estudio en muestra de vellosidad corial procedente de un DP convencional confirmó los resultados obtenidos en plasma materno.

➤ Caso 34: Retinosquiasis

Gestante portadora de la mutación c.626 G>A en el exón 6 del gen *RS1*, responsable de la enfermedad de Retinosquiasis (patología ligada al cromosoma X). El abordaje de la mutación materna se llevó a cabo mediante técnica de PCR Digital.

El estudio previo de determinación de sexo fetal mediante PCR a Tiempo Real reveló que el feto era varón. El valor de Z-score en la muestra de 8 semanas era (-0.85) en la de 10 semanas (-2.33) ante la discrepancia de resultados se solicitó una tercera muestra a las 12 semanas revelando un valor de Z-score de (-2.55). El valor combinado de las tres muestras era (-3.09). Los resultados por tanto mostraron un desequilibrio alélico, con una sobrerrepresentación del alelo normal (G) (VIC) respecto al alelo mutado (A) (FAM) a las 10 y 12 semanas de gestación determinando al feto como sano (Figura 33).

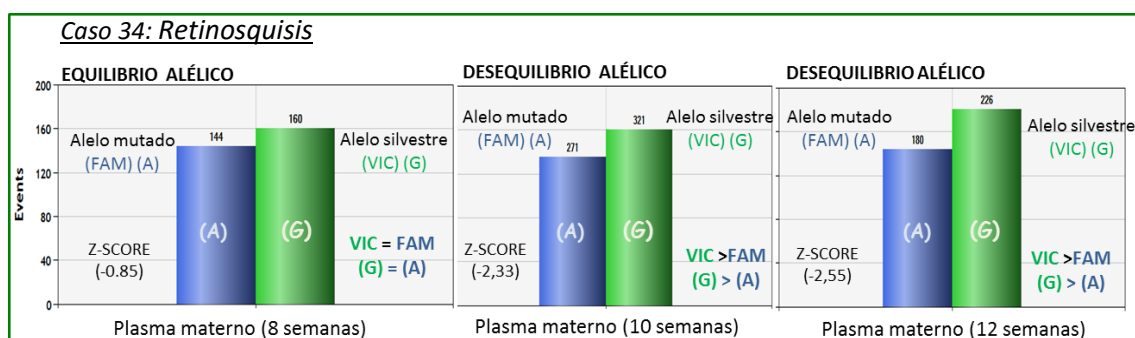


Figura 33. Resultado del estudio de la mutación materna c.626 G>A mediante técnica de PCR Digital reveló un desequilibrio alélico (G>A) (VIC>FAM) a las 10 y 12 semanas de gestación determinando al feto como sano.

Al tratarse de una gestación obtenida a través de un ciclo de DGP en el que un embrión sano fue transferido, la pareja no se realizó un DP convencional y los resultados de DPNI obtenidos se confirmaron al nacimiento.

Los resultados de los valores de Z-score calculados en los cinco casos que han sido estudiados mediante técnica de PCR Digital para poder determinar así el genotipo fetal en muestra de plasma materno se reflejan en la siguiente figura (Figura 34).

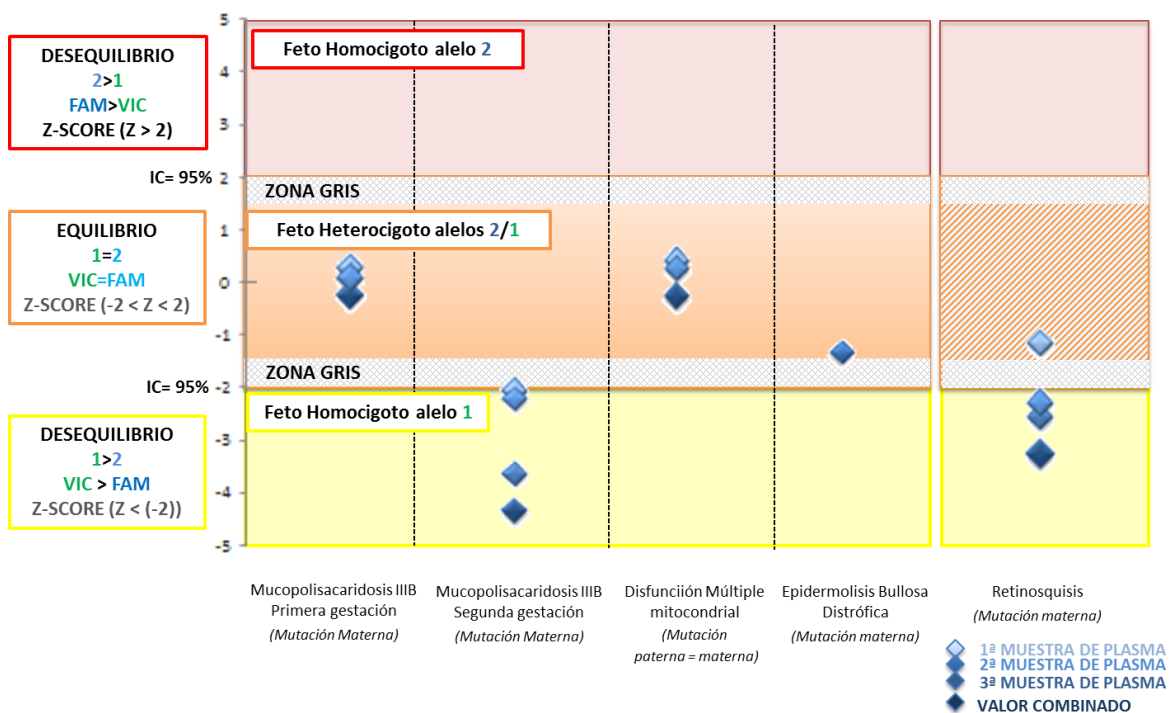


Figura 34. Resultados de los valores de Z-score en los cinco casos estudiados mediante cuantificación relativa de dosis (RMD) mediante en cálculo de los valores de Z-score para establecer el genotipo fetal en plasma materno.

TIPO DE HERENCIA	PATOLOGÍAS	SEMANAS DE GESTACIÓN	GENOTIPO MATERNO	GENOTIPO PATERNO	VALOR DE Z-SCORE	GENOTIPO PLASMA MATERNO	GENOTIPO FETAL	ESTIMACIÓN ADN FETAL	ESTATUS FETAL
ENFERMEDADES RECESIVAS	SÍNDROME DE SAN FILIPPO (PRIMER EMBARAZO)	10	GG	GA	N/A	GA	GA	18,6%	AFECTO (+/+)
		13			N/A	GA		33,2%	
		10	CT	CC	0,37	CT	CT	N/A	
		13			-0,19	CT			
		N/A			0,16	COMBINADO			
	SÍNDROME DE SAN FILIPPO (SEGUNDO EMBARAZO)	8	GG	GA	N/A	GG	GG	0%	SANO (-/-)
		10			N/A	GG		0%	
		12			N/A	GG		0%	
		8	CT	CC	-2,05	CC	CC	N/A	
		10			-2,22	CC			
12	-3,81	CC							
N/A	-4,6	COMBINADO							
MISMA MUTACIÓN	SÍNDROME DE DISFUNCIÓN MÚLTIPLE MITOCONDRIAL	10	GT	GT	-0,25	GT	GT	RASSF1A (2,5% y 3,4%)	SANO PORTADOR (+/-)
		11			0,49	GT			
		N/A			0,32	COMBINADO			
AUTOSOM DOMINANT MATERNA	EPIDERMOLISIS BULLOSA	20	GA	GG	-1,4	GA	GA	SRY (9,24%)	AFECTO (+/-)
LIGADA AL CR. X	RETINOSQUISIS	8	GA	GY	-0,85	G	GY	N/A	SANO (-)
		10			-2,33	G			
		11			-2,05	G			
		N/A			-3,09	COMBINADO			

Tabla 29. Resultados del genotipo fetal en todos los casos reales estudiados mediante ddPCR de las diferentes enfermedades monogénicas con los diversos patrones de herencia representados. Se indican los porcentajes de ADN fetal y los valores de Z-score en cada caso. También el resultado de DP y la conclusión de status fetal en cada caso. NA= No Aplica.

2. Resultados del estudio de Validación de la tecnología de PCR Digital

Tras el estudio de genotipado mediante PCR a Tiempo Real de los 6 SNPs del cromosoma 4 en 13 parejas y de un SNP del cromosoma X en 5 parejas se obtuvo un total de 55 casos informativos susceptibles de ser incluidos en el análisis de validación de la tecnología de PCR Digital. Se consideró que una pareja era informativa cuando cumplía que el padre, la madre o ambos progenitores fueran heterocigotos y que hubiera muestra de ADN de vellosidad corial o líquido amniótico (*Tabla 2, pág 33*).

De esta manera, mediante una estrategia de SNPs, la cual fue diseñada con el fin de validar esta tecnología para el estudio de mutaciones fetales de origen paterno y materno asociados a los diferentes modelos de herencia de las enfermedades monogénicas (autosómicas dominantes, autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X) (*Tabla 25, pág 31*).

Finalmente, se compararon los resultados observados en las muestras de plasma con la muestra de DP convencional (*Tabla 2*).

Los resultados de validación se clasificaron en dos grupos en función del abordaje de SNPs autosómicos (50/55 casos) o del cromosoma X (5/55 casos).

2.1 Resultados del estudio de SNPs autosómicos

Este grupo a su vez se puede subdividir en función del tipo de análisis requerido para el diagnóstico fetal: 2.1.1) Detección de alelos de origen paterno o “*de novo*” y 2.1.2) análisis de cuantificación mutacional relativa de dosis alélica (*Relative Mutation Dosage-RMD*) mediante cálculo del valor de Z-score (para el estudio de mutaciones de herencia materna).

2.1.1 Resultados para la detección de alelos fetales de origen paterno o “*de novo*”

En 9/19 casos el alelo paterno fue detectado en plasma materno, indicando la presencia de un feto heterocigoto para el SNP de estudio; en 9/19 casos no se detectó el alelo paterno en plasma materno, lo que se asoció a fetos con genotipo homocigoto normal y en 1/19 casos resultó no concluyente ya que no cumplía con los parámetros óptimos de calidad. En los 9 casos en los que el feto tenía genotipo homocigoto normal (mismo genotipo que la madre), se llevó a cabo la estimación de la presencia de ADN fetal (*Tabla 30*).

Todos estos resultados obtenidos en plasma materno se compararon con el genotipo fetal mostrado por el estudio de muestra de DP convencional. Todos los casos 18/18 fueron concordantes.

2.1.2 Resultados del análisis de cuantificación relativa de dosis alélica (RMD) mediante cálculo del valor de Z-score

En 7/31 casos se observó un desequilibrio alélico entre el alelo 1 (VIC) y el alelo 2 (FAM). De ellos 3/7 casos mostraban una sobrerrepresentación del alelo 2 (feto homocigoto FAM) con valores de Z-score superiores a 2 (>2). En los cuatro restantes una sobrerrepresentación del alelo 1 (feto homocigoto VIC) y por tanto con valores de Z-score menores a -2 (<-2) (*Figura 35*).

En 23/31 casos se observó un equilibrio de dosis alélica entre el alelo 1 y 2, con valores de Z-score comprendidos entre -2 y 2, (feto heterocigoto FAM/VIC). En este grupo dado que el genotipo fetal es igual al genotipo materno es recomendable una estimación de presencia de ADN fetal en la muestra de plasma materno para evitar un falso negativo (*Figura 35*).

Finalmente un caso no fue considerado para el estudio ya que no cumplía con los parámetros óptimos de calidad (*Tabla 30*).

Todos estos resultados obtenidos en plasma materno se compararon con el genotipo fetal obtenido del estudio en muestra de vello corial o de líquido amniótico. En 24 de los 30 casos los resultados fueron concordantes con el genotipo fetal. Uno de ellos resultó un Falso Negativo (FN) y los otros cinco estaban en la Zona Gris (ZG) (*Tabla 30*).

2.2 Resultados del estudio de SNP del cromosoma X

Este grupo a su vez se ha subdividido en función de estudio de casos de feto hembra (3/5 casos) o de feto varón (2/5 casos).

2.2.1 Casos de feto hembra

En 2/3 casos se observó un desequilibrio en la dosis alélica, sobrerrepresentando el alelo 1 (VIC) respecto al alelo 2 (FAM) (feto homocigoto VIC) con valores de Z-score por debajo de -2 (<-2). El tercer caso mostró un equilibrio entre el alelo 1 y el alelo 2, con valores de Z-score comprendidos entre -2 y 2 (*Figura 35*).

2.2.2 Casos de feto varón

Los dos casos estudiados mostraban un desequilibrio alélico. Uno de ellos mostraba una sobrerrepresentación del alelo 2 respecto al alelo 1 (feto homocigoto FAM) con un valor de Z-score superior a 2 (>2) y el otro caso una sobrerrepresentación del alelo 1 respecto al alelo 2 (feto homocigoto VIC) con valor de Z-score menor a -2 (<-2) (Figura 35).

Todos los casos estudiados para el abordaje de SNPs del cromosoma X concordaron con el genotipo fetal del DP convencional (5/5 casos) (Tabla 30).

Los resultados de los valores de Z-score calculados en los 36 casos que han sido considerados para cuantificación de dosis alélica (RMD) para poder determinar así el genotipo fetal en muestra de plasma materno se reflejan en la siguiente figura (Figura 35).

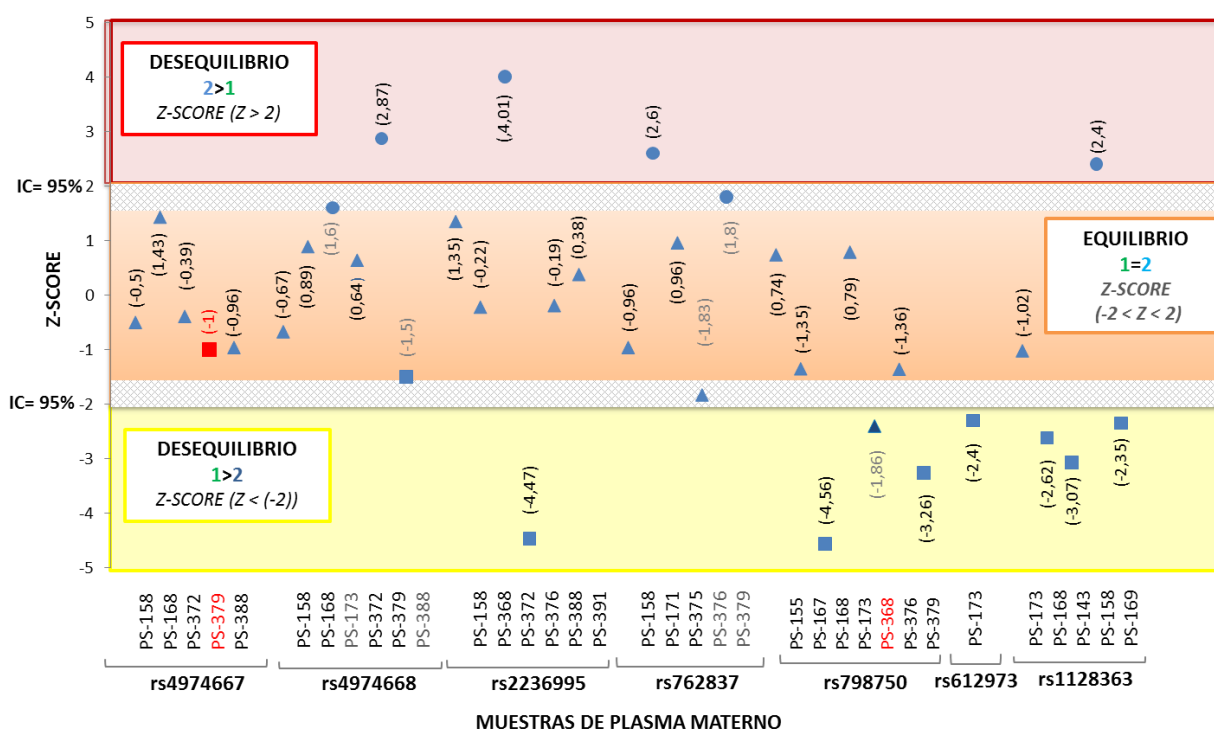


Figura 35. Resultado de los valores de Z-score en las 36 muestras consideradas para RMD para establecer el genotipo fetal en plasma materno. ● = Feto Homocigoto FAM (2>1) ▲ = Feto Heterocigoto FAM/VIC (2=1) and; ■ = Feto Homocigoto VIC (1>2).

Todos estos resultados obtenidos en plasma materno se compararon con el genotipo fetal obtenido del estudio en muestra de vellosidad corial o de líquido amniótico (Tabla 30).

2.3 Resultados de la estimación de ADN fetal en plasma materno en el estudio de validación de la PCR Digital

- El estudio de alelos fetales de origen paterno y su cuantificación mediante PCR Digital, reveló que el porcentaje de ADN fetal oscilaba entre un 5% y un 25% (con un valor medio de 13%).
- Estrategia de Multiplex *SRY/GAPDH*: se empleó en una única muestra de plasma materno (PM-158) revelando un porcentaje de 15.8% de ADN fetal.
- Estrategia de Multiplex *RASSF1A/GAPDH*: se realizó en tres muestras de plasma materno revelando los siguientes porcentajes de ADN fetal: PM-173 un 2.5%; PM-167 un 4.4% y PM-368 un 10.8%.

SNPs	Rs 4974667 (Cr 4)	Rs 4974668 (Cr 4)	Rs2236995 (Cr 4)	Rs762837 (Cr 4)	Rs798750 (Cr 4)	Rs612973 (Cr 4)	RS 1128363 (Cr X)	Confirmación de ADN fetal			
	MUESTRAS	Resultados DPNI vs DP	Resultados DPNI vs DP	Resultados DPNI vs DP	Resultados DPNI vs DP	Resultados DPNI vs DP	Resultados DPNI vs DP	Detección de SNP Pat/Deseq de SNP	Sexo Fetal	SRY vs GAPDH	RASSF1A vs GAPDH
143 (12 sem)							CGF	25%	♀		
155 (11 sem)	CGF	CGF		CGF	CGF			14,1%	♂		
158 (12 ¹³ sem)	CGF	CGF	CGF	CGF	CGF		CGF		♂	15,8%	
167 (13 sem)	NPC				CGF	CGF			♀		4,4%
168 (12 sem)	CGF	CGF	CGF		CGF	CGF	CGF	5%	♀		
169 (13 sem)							CGF	8,3%	♂		
171 (11 ¹³ sem)			CGF	CGF		CGF		8,4%	♂		
173 (12 sem)		ZG			CGF	CGF	CGF		♀		2,5%
368 (13 ¹² sem)			CGF	CGF	ZG	CGF			♀		10,8%
372 (17 sem)	CGF	CGF	CGF	CGF				13%	♀		
375 (15 sem)	CGF			CGF	NPC			16,4%	♀		
376 (15 sem)			CGF	ZG	CGF			16%	♀		
379 (16 sem)	FP	CGF	CGF	ZG	CGF			21%	♀		
388 (20 sem)	CGF	ZG	CGF			CGF		16,8%	♀		
391 (16 sem)			CGF	CGF	CGF	CGF		10,3%	♂		

Tabla 30. Resultados de genotipado de SNPs fetales estudiados en plasma materno en comparación con el genotipo establecido en muestra de DP convencional. Se incluye también la cantidad de ADN fetal de las muestras así como las semanas de gestación. [CGF= Genotipo Fetal Concordante; ZG: Zona Gris; NPC: No cumple Parámetro Calidad]

Nº de Caso	Enfermedades monogénicas	Patrón de herencia	Gen	Mutación/es		Resultados de DPNI				Estatus Fetal	Resultado DPNI vs Estatus fetal
						Abordaje Directo	Abordaje Indirecto	Estimación ADN fetal	Genotipo Fetal		
Caso 1	Antígeno Anti-KELL (OMIM #110900)	AD paterna	KEL (NM_000420)	♂	c.578 C>T	No Detección		SNP del Cr X	C/C	Sano C/C	✓
Caso 2	Epidermolisis Bullosa Distrófica (OMIM #131750)	AD paterna	COL7A1 (NM_000094)	♂	c.5381 G>A	Detección		N/A	G/A	Afecto G/A	✓
Caso 3	Síndrome de Rendu Osler Weber (OMIM #187300)	AD paterna	ENG (NM_001278)	♂	c.1414 C>T	Detección		SRY	C/T	Afecto C/T	✓
Caso 4	Aniridia (OMIM #106210)	AD paterna	PAX6 (NM_001604)	♂	c.949 C>T	No Detección		NO	C/C	Sano C/C	✓
Caso 5	Miopatía Nemaínica (OMIM #161800)	AD "de novo"	ACTA1 (NM_001100)		c.413 T>A	No Detección		NO	T/T	Sano T/T	✓
Caso 6	Síndrome de Marfan (OMIM #154700)	AD paterna	FBN1 (NM_000138)	♂	c.7636 G>A	No detección	No Amplificación	NO	G/G	Sano G/G	✓
Caso 7	Síndrome de Marfan (OMIM #154700)	AD paterna	FBN1 (NM_000138)	♂	c.7776 C>A	Detección	Detección alelo mutado	N/A	C/A	Afecto C/A	✓
Caso 8	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección expansión	No detección	N/A	Repet CAG	Afecto Repet CAG	✓
Caso 9	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	No detección	No detección	/	ND	Afecto Repet CAG	ND
Caso 10	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección alelo sano	No detección	N/A	No repet CAG	¿? Aborto	¿? Aborto
Caso 11	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección alelo sano	Detección alelo sano	N/A	No repet CAG	Sano No Repet	✓
Caso 12	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección expansión	No detección	N/A	Repet CAG	Afecto Repet CAG	✓
Caso 13	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	No detección	No detección	/	ND	¿? Aborto	¿? Aborto
Caso 14	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección alelo sano	Detección alelo sano	N/A	No repet CAG	Sano No Repet	✓

Nº de Caso	Enfermedades monogénicas	Patrón de herencia	Gen	Mutación/es		Resultados de DPNI				Estatus Fetal	Resultado DPNI vs Estatus fetal
						Abordaje Directo	Abordaje Indirecto	Estimación ADN fetal	Genotipo Fetal		
Caso 15	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	Detección alelo sano	No detección	N/A	No Repet CAG	Afecto Repet CAG	*
Caso 16	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	No detección	No detección	NO	ND	Sano No Repet	ND
Caso 17	Enfermedad de Huntington (OMIM #143100)	AD paterna	HTT (NM_002111)	♂	Repeticiones CAG	No detección	No detección	NO	ND	Sano No Repet	ND
Caso 18	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142)		c.1138 G>A	Detección	/	SRY	G/A	Afecto G/A	✓
Caso 19	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142)		c.1138 G>A	No detección	/	SRY	G/G	Sano G/G	✓
Caso 20	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142)		c.1138 G>A	Detección	/	SRY	G/A	Afecto G/A	✓
Caso 21	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142)		c.1138 G>A	Detección	/	SRY	G/A	Afecto G/A	✓
Caso 22	Acondroplasia (OMIM #100800)	AD "de novo"	FGFR3 (NM_000142)		c.1138 G>A	No detección	/	NO	G/G	¿? Aborto	¿? Aborto
Caso 23	Síndrome de Bartter (OMIM #607364)	AR	CLCNKB (NM_000085)	♂	c.1783 C>T	No detección	/	SRY	C/C	Sano (port mut mat)	✓
				♀	c.610 G>A	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 24	Síndrome de Ellis Van Creveld (OMIM #225500)	AR	EVC2 (NM_147127)	♂	c.2029 C>T	No detección	/	SRY	C/C	Sano (port mut mat)	✓
				♀	c.645 G>A	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 25	Hipoplasia de Cartilago-pelo (OMIM #250250)	AR	RMRP (NM_003051)	♂	c.236 A>G	No detección	/	Multiplex SRY/mut	A/A	Sano (port mut mat)	✓
				♀	c.258 G>A	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 26	Fibrosis Quística (OMIM #219700)	AR	CFTR (NM_000492)	♂	c.3484 C>T	Detección	No detección	N/A	C/T	Sano (port mut pat)	✓
				♀	c.3846 G>A	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 27	Fibrosis Quística (OMIM #219700)	AR	CFTR (NM_000492)	♂	c.3484 C>T	No detección	No detección	NO	ND	Sano	ND
				♀	c.3846 G>A	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 28	Epidermolisis Bullosa Juntural tipo Herlitz (OMIM #226700)	AR	LAMC2 (NM_005562)	♂	c.2074 C>T	Detección	/	NA	C/T	Afecto	✓
				♀	c.3343delGT	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 29	Defecto de glicosilación (OMIM #212065)	AR	PMM2 (NM_000303)	♂	c.710 C>T	Detección	/	NA	C/T	Sano (port mut pat)	✓
				♀	c.470 T>C	NA		NA	NA	NA	NA
Caso 30	Síndrome de San Filippo (OMIM #252920)	AR	NAGLU (NM_000263)	♂	c.503 G>A	Detección	Detección alelos mutado	NA	G/A	Afecto	✓
				♀	c.1696 C>T	Equilibrio (C=T)		NA	C/T	NA	
Caso 31	Síndrome de San Filippo (OMIM #252920)	AR	NAGLU (NM_000263)	♂	c.503 G>A	No detección	Detección alelo silvestre	N/A	G/G	Sano	✓
				♀	c.1696 C>T	Desequilibrio (C>T)		N/A	C/C	NA	
Caso 32	Disfunción múltiple mitocondrial (OMIM #605711)	AR (=mut)	NFU1 (NM_015700)	♂	c.622 G>T	Equilibrio (G=T)	/	RASSF1A / GAPDH	G/T	Portador	✓
				♀	c.622 G>T						
Caso 33	Epidermolisis Bullosa Distrófica (OMIM #131750)	AD materna	COL7A1 (NM_000094)	♀	c.5381 G>A	Equilibrio (G=A)	/	SRY / GAPDH	G/A	Afecto	✓
Caso 34	Retinosquisis (OMIM #312700)	Ligada al X	RS1 (NM_000330)	♀	C.626 G>A	Desequilibrio (G>A)	/	N/A	G/G	Sano	✓

Tabla 31. Resumen de los resultados de DPNI obtenidos en los 34 casos de Enfermedades Monogénica.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Esta Tesis se enmarca dentro de la investigación sobre el Diagnóstico Prenatal No Invasivo (DPNI) a partir del estudio del material genético fetal presente en sangre periférica de gestantes, que es hoy en día una realidad dentro de la medicina fetal. Actualmente, el DPNI se ha incorporado en la rutina del seguimiento prenatal con estudios como: la determinación del sexo fetal en gestaciones con riesgo de una enfermedad ligada al sexo, el estudio del factor RhD fetal en gestantes Rh negativas, la determinación del antígeno Kell, segundo anticuerpo en frecuencia después del anti-D en causar isoimmunización feto-materna, cribado de las aneuploidias más frecuentes y el diagnóstico de mutaciones de origen exclusivamente paterno o *de novo*. A pesar de los grandes avances que este campo ha experimentado en los últimos años, el DPNI de enfermedades monogénicas de origen materno no está disponible aún en la rutina clínica debido a las peculiaridades de la muestra que dificultan su abordaje.

El presente trabajo se centra en el estudio del DPNI en gestantes portadoras de enfermedades monogénicas, mayoritariamente englobadas dentro de las Enfermedades Raras (ER), con baja frecuencia en la población. Aunque se considera que una ER afecta a menos de 5 de cada 10.000 habitantes, todas ellas en su conjunto afectan al 7 % de la población mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS); en consecuencia, son muchas las parejas que pueden verse beneficiadas de un DPNI.

Tradicionalmente todas aquellas parejas portadoras de alguna enfermedad monogénica con deseo de descendencia sana tenían como única opción diagnóstica disponible el Diagnóstico Prenatal convencional, mediante biopsia corial o amniocentesis, técnicas que conllevan cierto riesgo de pérdida fetal (Akolekar y cols., 2015). Actualmente, el abanico de opciones para estas pacientes ha aumentado gracias a la incorporación de dos diagnósticos: el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), donde se seleccionan genéticamente los embriones sanos, libres de la mutación/es responsable de la enfermedad, y el Diagnóstico Prenatal No Invasivo en sangre materna, el cual se plantea como alternativa a la realización de un DP convencional. El gran valor del DPNI es ser una opción segura y no invasiva en el manejo de estas gestaciones, ampliando así las opciones diagnósticas a considerar en el asesoramiento genético ofrecido a estas parejas.

Los estudios de DPNI, además de presentar la ventaja de ser no invasivos, permiten emitir un resultado temprano en la gestación respecto a la condición fetal de estudio. Según está documentado, a partir de la quinta semana de gestación es posible detectar el ADN fetal

liberado por las células trofoblásticas de la placenta al torrente sanguíneo materno (Chat et al., 2004). A partir de ese momento, el porcentaje de ADN fetal en el plasma materno va aumentando a medida que avanza la gestación (Galbiati y cols., 2005, Wang y cols., 2013). Estos dos hechos, junto con los resultados obtenidos de trabajos previos de nuestro grupo, derivaron en el establecimiento como protocolo interno en la recogida de al menos dos muestras de plasma materno a diferentes semanas gestacionales a partir de la séptima semana de embarazo (Bustamante-Aragonés y cols., 2008b).

A pesar de la temprana detección de este ADN fetal en sangre periférica materna, existen ciertas características de la muestra biológica que plantean dificultades técnicas para su abordaje, como son: 1) la coexistencia de ADN fetal y ADN materno en la sangre de las gestantes y la incapacidad actual de separarlos, 2) el bajo porcentaje de ADN fetal respecto al materno, aumentando aproximadamente entre un 9%-20% a lo largo de la gestación (Lun y cols., 2008a) y 3) el carácter fragmentado del ADN fetal y de menor tamaño (< 200 pb) que el de los fragmentos de origen materno (Yu y cols., 2014). Debido a estas dificultades, los primeros trabajos realizados a partir de este material genético se centraron en el análisis de regiones genómicas fetales ausentes en el genoma materno, y cuya presencia en plasma materno solo estaría justificada por su origen fetal. En referencia al estudio de enfermedades monogénicas, inicialmente se estudiaban aquellas patologías heredadas vía paterna y defectos originados *de novo* en el feto (Saker y cols., 2006; Saito y cols., 2000), en base a un criterio de presencia/ausencia. Sin embargo, el estudio de mutaciones fetales de herencia materna suponía una limitación técnica para su abordaje.

Tras la reciente incorporación en el campo de la biología molecular de nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva o la PCR Digital, se están empezando a solventar las limitaciones técnicas asociadas al estudio de esta peculiar muestra biológica y se están realizando con éxito estudios previamente no abordables, entre los que se encuentra, dentro del estudio de enfermedades monogénicas, el estudio no invasivo de aquellas enfermedades de origen materno. En esa línea, esta tesis doctoral tiene como objetivo general el estudio de mutaciones fetales en plasma materno con independencia del origen parental.

La primera parte del trabajo ha consistido en la ampliación del espectro diagnóstico de diferentes enfermedades monogénicas, de herencia paterna o *de novo*, con el uso de técnicas como la minisequenciación y la QF-PCR. Tras la aparición de estudios preliminares que demuestran la elevada sensibilidad de una de las nuevas tecnologías emergentes, la PCR Digital (Hindson y cols., 2011), la segunda parte de la Tesis está enfocada a la validación y

puesta a punto de dicha tecnología con el fin de abordar el estudio de enfermedades donde la madre, el padre, o ambos sean los portadores de una mutación causante de una determinada enfermedad monogénica.

Abordaje prenatal no invasivo de enfermedades monogénicas de herencia paterna y de novo.

De la mano de las técnicas de rutina disponibles en un laboratorio de biología molecular y previamente empleadas en DP convencional y en DPNI, en esta tesis se ha aumentado el número de casos de DPNI en los que se analiza el estatus fetal con respecto a una mutación de origen paterno o *de novo* asociados a una enfermedad monogénica. Todos los estudios se han basado en un criterio de presencia/ausencia de la mutación de herencia paterna o *de novo* asociado a enfermedades dominantes o recesivas.

Enfermedades monogénicas de herencia dominante paterna y de novo

Este primer grupo de casos, incluye 22 gestaciones en las que el padre del feto era portador de una mutación asociada a una patología con patrón de herencia autosómico dominante o gestaciones en que los hallazgos ecográficos hacían sospechar de una mutación surgida *de novo* en el feto. Este abordaje en plasma materno permite evitar la necesidad de un DP convencional al diagnosticar al feto como sano en caso de no detectar el cambio, o afecto en caso de observar su presencia. Algunos casos que han sido llevados a cabo previamente con éxito de enfermedades autosómicas dominantes en sangre materna son, la distonía de desarrollo precoz (Meaney y cols., 2009), la acondroplasia (ACH) (Chitty y cols., 2011) o la Enfermedad de Huntington (EH) (Bustamante-Aragones y cols., 2008) entre otras.

En esta tesis se ha aumentado la casuística de estudio de enfermedades previamente abordadas, como son la EH (10/22 casos) de herencia familiar paterna, o la ACH (5/22) en casos surgidos *de novo* y, además, se introduce el estudio de nuevas patologías no diagnosticadas previamente de manera no invasiva como el antígeno Kell (1/22), Síndrome de Marfan (2/22), Epidermolisis Bullosa (1/22), Síndrome de Rendu Osler Weber (1/22), Aniridia (1/22) o Miopatía Nematínica (1/22). Todos los casos fueron incluidos por antecedentes familiares, excepto los casos de acondroplasia donde sin antecedentes familiares de displasia ósea, alteraciones en los parámetros ecográficos indujeron a la sospecha de un feto con alguna displasia esquelética.

Los casos presentados en este trabajo para estudio de Enfermedad de Huntington, patología causada por una mutación dinámica debida a una expansión de repeticiones del triplete CAG en el gen *HTT*, han seguido el mismo abordaje que el que actualmente se emplea en un laboratorio de rutina para el estudio prenatal convencional: estudio directo de la expansión y estudio indirecto por marcadores microsatélite, flanqueantes al gen *HTT*, mediante QF-PCR.

Los primeros estudios no invasivos de EH surgen a partir del año 2003 (González-González y cols., 2003) basándose en el análisis directo del número de repeticiones del triplete CAG. Más tarde en el año 2008 se diagnosticó un nuevo caso mediante el estudio indirecto por marcadores microsatélite, flanqueantes al gen *HTT* (González-González y cols., 2008). En este mismo año el trabajo llevado a cabo por Bustamante-Aragonés y cols añadió cuatro nuevos casos en los que emplearon ambas estrategias (estudio directo de la expansión y estudio indirecto por marcadores STRs) con el fin de aumentar la tasa diagnóstica; trabajo tras el cual se observó un 75% de éxito para el método directo y un 25% para el indirecto (Bustamante-Aragonés y cols., 2008). Más recientemente, en el año 2015, se ha publicado un trabajo que incluye 20 nuevos casos de EH (Van der Oever y cols., 2015), abordados únicamente de manera directa tras la que obtienen una tasa diagnóstica del 75%, igual a la descrita previamente por nuestro grupo.

En el presente trabajo se han estudiado 10 nuevos fetos con riesgo de padecer Enfermedad de Huntington, siguiendo la estrategia de los trabajos previos llevados a cabo por el grupo (González-González y cols., 2008; Bustamante-Aragonés y cols., 2008). En ellos se ha incluido el abordaje directo de la expansión de tripletes en todos los casos (10/10) y en 9/10 también se ha realizado el estudio indirecto partir de alguno de los marcadores microsatélite flanqueantes al gen *HTT* (I1CAHD, D4S126, D4S127 y D4S182). La inclusión de este segundo abordaje indirecto, pretende solventar alguna de las siguientes situaciones que dificultan llegar a un diagnóstico mediante el estudio aislado de la mutación: a) coincidencia entre el alelo sano paterno y alguno de los alelos maternos y, b) por no detección de grandes expansiones debido al carácter fragmentado del ADN fetal consecuencia del menor tamaño que presentan los alelos fetales (tamaño menor a <200 pb).

A diferencia de las publicaciones anteriores, en el presente trabajo, el abordaje directo ha mostrado una tasa de detección del 50% y el estudio indirecto del 20% frente a las tasas superiores observadas en estudios previos (50% vs 75% en el estudio directo y 20% vs 25% para el estudio indirecto). La baja eficiencia de la técnica de QF-PCR mediante ambos

abordajes puede asociarse a la complejidad de las regiones de estudio, básicamente derivado de dos fenómenos: 1) dificultad técnica que supone el estudio de regiones repetidas y, 2) como consecuencia del carácter dinucleótido que presentan los microsátélites empleados que llevan asociado la amplificación de lo que se conoce como “Bandas fantasma” (*Stutter Bands*). Estas “*bandas fantasma*” son artefactos derivados de los fallos que comete la polimerasa al amplificar regiones repetidas y puede dificultar la interpretación en aquellos casos donde el alelo paterno y materno están muy próximos no pudiéndose diferenciar el alelo fetal de origen paterno de los artefactos asociados al alelo de la madre.

Además de la menor sensibilidad observada hubo un caso de Falso negativo (caso 15) que derivó de la interpretación de un producto de amplificación inespecífica de tamaño similar al alelo paterno silvestre posiblemente como consecuencia de una contaminación exógena.

El valor de este trabajo, a pesar de lo discutido anteriormente, es aumentar la casuística existente resaltando la problemática asociada al estudio de mutaciones dinámicas en plasma materno, y proponiendo soluciones como la consideración de procesos previos a la PCR, como la concentración del ADN y enriquecimiento de la muestra de plasma materno, o como lo propuesto por el grupo de Van der Oever *et al* en el que incluyen sondas bloqueantes de la amplificación de secuencias maternas, lo que favorece la amplificación preferentemente de las secuencias fetales que incluyen el alelo paterno heredado por el feto.

El resto de casos abordados en este trabajo con patrón de herencia autosómico dominante y causados por una mutación puntual (no dinámica) de herencia paterna, fueron correctamente diagnosticados (7/7) luego en todos los casos podría haberse evitado la realización de un DP convencional. Este grupo incluye un caso de gestante Kell negativa (kk) con pareja Kell positiva (Kk) (caso 1) con riesgo de una posible isoimmunización anti-Kell en caso de feto positivo. La posibilidad de determinar el genotipo en ADN fetal en plasma materno en estos casos, se realiza a comienzos del segundo trimestre y la información que proporciona permite afrontar más precozmente el manejo de la gestación y del posible tratamiento del feto. En el caso estudiado no se detectó el cambio en ninguna de las muestras de plasma materno recogidas a las 12 y 15 semanas de gestación, descartando así la isoimmunización feto-materna en dicho embarazo.

Los casos de Epidermolisis Bullosa Distrófica (caso 2), Rendu Osler Weber (caso 3) y Síndrome de Marfan (caso 7) revelaron la presencia de la mutación paterna en plasma materno, diagnosticando al feto como afecto de la enfermedad en los tres casos. En los casos

de Aniridia (caso 4), Miopatía Nematínica (caso 5) y Síndrome de Marfan (caso 6), por el contrario, no se observó la presencia del cambio paterno, y los fetos fueron diagnosticados como sanos. Aun habiendo diagnosticado correctamente todos los casos, dada la coincidencia genotípica ente madre y feto en los casos 4, 5, 6 y ante la posibilidad de un falso negativo consecuencia de un bajo porcentaje de ADN fetal en sangre materna, es recomendable la estimación del porcentaje de ADN fetal en la muestra. A raíz de la incorporación de los test de cribado de las aneuploidías más frecuentes, la estimación del porcentaje de ADN fetal en la muestra de plasma materno está adquiriendo una gran relevancia de cara a minimizar la tasa de falsos negativos (Pergament y cols., 2014; Revello y cols., 2016). Esto se muestra más en detalle en el apartado de estimación del porcentaje de ADN fetal.

En esta tesis, también se pretendió ampliar la validación de la técnica de QF-PCR para el estudio de enfermedades monogénicas. Para ello se realizó este abordaje en aquellos casos en los que existía un estudio familiar previo de haplotipos. Al igual que con los casos de EH, se ha incorporado el estudio indirecto por marcadores microsatélite mediante técnica de QF-PCR, en los casos asociados a Síndrome de Marfan (casos 6 y 7), Fibrosis Quística (casos 26 y 27) y Síndrome de San Filippo (casos 30 y 31). Este abordaje adquiere especial relevancia en aquellos casos donde la mutación puntual paterna no es detectada por estudio directo con el fin de evitar un falso negativo. En 3/6 casos abordados mediante estudio indirecto se detectó el alelo paterno de origen fetal de alguno de los marcadores microsatélite estudiados, apoyando el resultado previo del estudio directo. En 3/6 casos restantes no se detectó ningún alelo fetal en plasma materno, hecho que se asocia a los mismos fenómenos que los explicados para la EH, derivando finalmente en una tasa de no detección del 50%.

El DPNI en sangre materna supone una seria alternativa al DP en el caso de gestaciones con sospecha ecográfica de una patología dominante *de novo*, como por ejemplo acondroplasia (Saito y cols., 2000; Li y cols., 2007; Chitty y cols., 2011; Orhant y cols., 2016). La acondroplasia es una enfermedad que en el 80% de los casos surge *de novo* (Laederich y cols., 2011), está asociada en muchos casos a edad paterna avanzada (Orioli y cols., 1995; Wilkin y cols., 1998) y el 98% de los casos presentan una mutación prevalente (c.1138 G>A). Otro 1% se explica por un cambio de G>C en la misma posición, lo que implica que se pueda explicar así el 99% de los casos de acondroplasia. En la gran mayoría de estos casos se sospecha la afectación fetal en un reconocimiento ecográfico en el tercer trimestre de gestación, realizando generalmente la confirmación genética al nacimiento. El estudio en plasma materno permite la confirmación genética del diagnóstico ecográfico en el tercer trimestre. Este diagnóstico, en

caso de feto afecto, permite a la pareja contar con un periodo de adaptación psicológica antes del parto. En esta Tesis se ha incluido el estudio de la posición genómica que cubre el 99% de los casos (c.1138) en cinco gestaciones con parámetros ecográficos alterados observados en el tercer trimestre de gestación. En tres de ellos se detectó el cambio c.1138 G>A en sangre materna, pudiendo diagnosticar a los fetos como afectados de Acondroplasia. Se confirmó el resultado posterior mediante DP o al nacimiento. Sin embargo, en los otros dos casos no se detectó ninguna mutación, lo que descartaba la afectación fetal por acondroplasia, pero no descartaba que el feto fuera portador de alguna otra mutación diferente asociada a otra displasia ósea. El seguimiento postnatal en uno de los fetos donde no se detectó ningún cambio (caso 19) no pudo llevarse a cabo dado que era un caso remitido de otro centro y el otro feto (caso 22) no pudo confirmarse dado que la gestante sufrió un aborto espontáneo.

En el campo de las displasias óseas, actualmente y gracias a la incorporación de las nuevas tecnologías, se ha introducido a la rutina clínica en el Reino Unido el primer DPNI para mutaciones paternas o *de novo* en sangre materna, donde se incluye no sólo la mutación prevalente asociada a acondroplasia, sino un total de 29 mutaciones en el gen *FGFR3* asociadas a ésta y otras displasias tanatofóricas (Chitty y cols., 2011; Chitty y cols., 2015). También ofrecen el test para el estudio de 28 mutaciones en el gen *FGFR2* asociadas a Craniosinostosis y otras 3 mutaciones en el mismo gen asociadas a Síndrome de Apert. Este panel adquiere un especial interés en aquellos casos de mutaciones surgidas *de novo*, ofreciendo un cribado más ampliado que incluye los genes *FGFR3* o *FGFR2*. Sin embargo, solo supondrá un valor añadido si la mutación está incluida en el panel, dejando fuera otro tipo de mutaciones dentro de estos genes o asociados a otras displasias que pueden surgir también *de novo*, como sucede con algunos casos de Osteogénesis Imperfecta la cual se asocia a mutaciones en los genes *COL1A1*, *COL1A2*. Por otro lado, en aquellos casos en los que exista una historia familiar de displasia ósea con mutación identificada el estudio del panel pierde eficiencia ya que el estudio dirigido de dicho cambio en sangre materna resultaría un abordaje más eficaz para llegar al diagnóstico.

Enfermedades monogénicas de herencia recesiva con progenitores portadores de mutaciones diferentes

Siguiendo el mismo criterio que en el apartado anterior, el diagnóstico de estos casos se ha basado en un criterio de presencia/ausencia del defecto paterno. La ausencia de la mutación paterna en sangre materna conferiría al feto la condición de sano o, a lo sumo de portador de la mutación materna, evitando así la necesidad de un DP convencional; por el

contrario, en el caso de detección de la mutación de origen paterno el riesgo teórico del 25% correspondiente a una enfermedad recesiva aumenta hasta el 50%. Algunos ejemplos de enfermedades de herencia recesiva previamente abordadas para su estudio no invasivo en sangre materna son: hiperplasia adrenal congénita (Chiu *y cols.*, 2002), fibrosis quística (González-González *y cols.*, 2002, Nasis *y cols.*, 2004), amaurosis congénita de Leber (Bustamante-Aragonés *y cols.*, 2006), β -talasemia (Tungwiwat *y cols.*, 2007; Chan *y cols.*, 2010) y atrofia muscular espinal (Skirton *y cols.*, 2015).

En esta investigación se amplía en nueve casos el abordaje no invasivo de enfermedades de herencia recesiva asociadas a siete patologías diferentes, donde ambos progenitores eran portadores de mutaciones distintas asociadas a la enfermedad. En 8 de los 9 casos fue posible diagnosticar correctamente al feto respecto al carácter de portador/no portador de la mutación paterna mediante técnica de minisequenciación. En los casos de Síndrome de Bartter (caso 23), de Síndrome de Ellis van Creveld (caso 24), de Hipoplasia de cartílago-pelo (caso 25) y de Síndrome de San Filippo (caso 31) no se detectó la mutación paterna en plasma materno diagnosticando por tanto al feto como sano. Por el contrario, en los casos de Fibrosis Quística (caso 26), de Epidermolisis Bullosa tipo Herlitz (caso 28), de Defecto de Glicosilación (caso 29) y de Síndrome de San Filippo (caso 30) se detectó la mutación paterna aumentando el riesgo teórico del 25% de ser un feto afecto al 50%. Solo hubo un caso de Fibrosis Quística (caso 27) donde no pudo emitirse un resultado de DPNI debido a la presencia de un artefacto en el electroferograma, que enmascaraba la mutación y por tanto no permitió emitir un resultado respecto a la condición fetal.

La Fibrosis Quística es una enfermedad que ha sido ampliamente estudiada de forma no invasiva por ser una de las enfermedades con mayor prevalencia dentro de las ER. Recientemente se ha incorporado el DPNI de esta enfermedad a la rutina clínica en el Reino Unido incluyendo el análisis simultáneo en plasma materno de 11 mutaciones de herencia paterna. La inclusión de casos para este estudio parte de la premisa previamente mencionada de que ambos progenitores sean portadores de mutaciones diferentes (Hill *y cols.*, 2015).

Esta nueva incorporación puede resultar una ventaja coste-efectiva siempre que se reúna un número de familias que cumpla el requisito previamente mencionado (padres portadores de diferentes mutaciones), y que la mutación paterna asociada sea una de las 11 incluidas en el estudio; entre las que se encuentra la mutación más frecuente (Phe508del), que es responsable del 60% de los enfermos de FQ en el mundo (Mateu *y cols.*, 2002). Sin embargo son más de 2000 las mutaciones diferentes descritas en el gen *CFTR* asociadas a FQ (CF

Mutation Data Base <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) todas de muy baja prevalencia, salvo la Phe508del y otras 4 mutaciones cuya prevalencia es mayor del 2 %. Al recoger las mutaciones más frecuentes, el estudio simultáneo de las 11 mutaciones supondría una ventaja como herramienta de cribado en caso de hallazgo ecográfico que puede asociarse a un feto afecto de FQ en casos donde la pareja desconoce su condición de portador. Sin embargo, en casos de mutación identificada, el panel pierde sentido, siendo el estudio dirigido el abordaje más coste-efectivo y aplicable a cualquier mutación independientemente de la prevalencia.

Abordaje prenatal no invasivo de enfermedades monogénicas con independencia del origen parental y del modelo de herencia.

El término Enfermedad Monogénica es un término muy amplio que incluye un gran número de patologías, genes y mutaciones. En parejas en las que se ha identificado la causa genética de la enfermedad familiar, es posible ofrecer un DP. El abordaje técnico de un caso de DP de una enfermedad monogénica es variable y dependiente del tipo de mutación a estudio, en función de ello se utilizan distintas técnicas como MLPA, secuenciación o QF-PCR. Lo mismo sucede para los estudios de DPNI donde cada caso es abordado de manera individual e independiente, pero donde además existen limitaciones técnicas asociadas a las particularidades previamente descritas de la muestra de plasma materno. Para solventar estas limitaciones, es imprescindible la aplicación de las nuevas tecnologías.

El avance de la biología molecular ha dado lugar a la aparición de técnicas con mayor sensibilidad de detección y cuantificación que han permitido avanzar notablemente en el campo del estudio de ADN minoritario. Desde la introducción de las técnicas de Secuenciación Masiva y PCR Digital, el aumento de aplicaciones del estudio de ADN fetal en sangre periférica materna ha sido exponencial. Inicialmente estas técnicas se centraron en el desarrollo de tests de cribado para las aneuploidías más frecuentes (trisomía 21, 18 y 13) por ser el grupo de gestantes más numeroso que puede beneficiarse de su incorporación en la práctica clínica. Una vez que estos test se han estandarizado, los esfuerzos en la investigación actualmente se están dedicando a abordar el estudio de enfermedades monogénicas.

Como se ha descrito anteriormente, el estudio de mutaciones paternas o *de novo* ha podido ser abordado a partir de técnicas de rutina tales como QF-PCR o minisequenciación, no sucede lo mismo con todas aquellas enfermedades donde la gestante es la portadora de la mutación responsable de la enfermedad. La aplicación de nuevas tecnologías (Secuenciación Masiva y PCR Digital) de mayor sensibilidad abre el campo del DPNI al estudio de alelos fetales

de herencia materna en enfermedades monogénicas (Tsui y cols., 2011; Gu y cols., 2014; Chu y cols., 2015). La PCR Digital supone una ventaja respecto a la secuenciación masiva por la capacidad ya demostrada en permitir llevar a cabo estudios dirigidos en gestantes portadoras de enfermedades monogénicas (Barrett y cols., 2014) de manera rápida y sencilla evitando además la necesidad de infraestructuras bioinformáticas para su posterior análisis de datos.

Considerando las ventajas que aporta el empleo de estas nuevas técnicas para el estudio del ADN fetal en sangre materna, la segunda parte de esta Tesis se ha centrado en la validación y posterior aplicación de la técnica de PCR Digital para el abordaje de mutaciones fetales con independencia del origen parental y del modelo de herencia. La finalidad era doble; por un lado evaluar si esta técnica presentaba una mayor sensibilidad en la detección de mutaciones paternas respecto a las herramientas expuestas en la primera parte del trabajo y, por otro lado, resolver el gran reto de abordar aquellas enfermedades de herencia materna que no podían ser estudiadas mediante las técnicas anteriores debido a la menor eficacia de cuantificación que presentan.

La baja prevalencia de las enfermedades monogénicas, dificulta la obtención de un número significativo de casos y por ello, la validación de la técnica de ddPCR se realizó basada en una estrategia de SNPs (no asociados a ninguna patología) que permitía, tras la selección de parejas candidatas, simular los diferentes modelos de herencia que se pueden dar en casos de diagnóstico prenatal. El objetivo final era evaluar el potencial clínico de esta tecnología de PCR Digital para el Diagnóstico Prenatal No Invasivo de enfermedades monogénicas.

Con respecto a la capacidad de la técnica de ddPCR para el estudio de mutaciones fetales de origen paterno o *de novo* el estudio de validación ha revelado que la sensibilidad, eficacia, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) es del 100%, frente a una tasa de sensibilidad del 96 %, sin falsos positivos y negativos, para la técnica de minisequenciación. Por tanto, esta nueva técnica ha mostrado ser *a priori* una herramienta eficaz y más sensible para el estudio de mutaciones puntuales fetales de origen paterno.

Tras la validación, se estudiaron dos gestaciones consecutivas de una pareja de portadores de mutaciones diferentes asociadas al Síndrome de San Filippo (casos 30 y 31). El resultado de PCR Digital para el estudio de la mutación paterna confirmó los estudios previos de minisequenciación y QF-PCR en ambas gestaciones. En el primer embarazo, adicionalmente a la confirmación de presencia de la mutación paterna en las dos muestras de plasma materno recogidas a las 8 y 10 semanas de gestación, indirectamente se obtuvo una estimación del

porcentaje de ADN fetal del 26 %. Por el contrario, en la segunda gestación, donde no se había detectado la mutación paterna por estudio directo mediante minisequenciación y se había detectado el alelo sano por indirecto, tampoco se observó la presencia del alelo mutado por ddPCR confirmando de nuevo los resultados previamente obtenidos por las técnicas de rutina.

El estudio de mutaciones de herencia materna suponía un reto aún mayor. El potencial de la técnica de ddPCR para este segundo objetivo no se basaba en el criterio de presencia/ausencia de la mutación en plasma materno, sino en la capacidad de esta tecnología para realizar una cuantificación relativa muy precisa de dosis alélica (*RMD-Relative Mutation Dosage*) (Lun y cols., 2008b). Esta cuantificación permite determinar la existencia del equilibrio/desequilibrio entre el alelo mutado y el alelo silvestre, resultado de la contribución alélica fetal en plasma materno que permite en última instancia asociar al feto un genotipo determinado. La baja contribución fetal al ADN total en el plasma materno implica que el desequilibrio sea muy *sutil* y que requiera de un análisis estadístico que lo valore con una alta confianza (valor de *Z-score*). La posterior interpretación clínica de este equilibrio/desequilibrio alélico va a depender del modelo de herencia de cada enfermedad.

En los casos de gestantes portadoras de una mutación responsable de una enfermedad autosómica dominante (modelo de herencia simulado en 18/36 casos) se presentan dos opciones: a) un desequilibrio alélico donde el alelo silvestre está sobrerrepresentado respecto al alelo mutado, diagnosticando, por tanto, al feto como sano, y b) un equilibrio alélico entre alelo silvestre y mutado que significa que el genotipo fetal y materno coinciden y por tanto se trata de un feto afecto. Para descartar en este segundo caso que el equilibrio alélico no se deba a un bajo porcentaje de ADN fetal en la muestra estudiada, es recomendable la valoración del porcentaje de ADN fetal a partir de una estrategia de *SRY/GAPDH* en casos de feto varón, y *RASSF1A/GAPDH* en caso de feto hembra como se detalla más adelante.

El estudio en plasma materno, en los casos de progenitores portadores de una misma mutación asociada a una enfermedad de herencia recesiva (13/36 casos de validación) ofrecen tres posibilidades en el resultado: a) feto sano que da lugar a un desequilibrio alélico a favor del alelo silvestre respecto al mutado, b) feto afecto que da lugar a un desequilibrio alélico a favor del alelo mutado y c) feto portador de la mutación que da lugar a un equilibrio alélico. En esta tercera opción, dada la coincidencia genotípica entre madre y feto, es recomendable la estimación del porcentaje de ADN fetal para descartar un falso negativo.

Finalmente, en las enfermedades de herencia ligada al cromosoma X (simulación realizada en 5/36 casos). Tres de ellos eran fetos hembra cuya interpretación es la misma que la explicada para enfermedades de herencia dominante materna. Y dos de los cinco casos se trataban de fetos varón donde la interpretación adquiere un matiz diferente a los patrones de herencia previamente expuestos. En estos casos, como consecuencia de la contribución de un único alelo fetal asociado al cromosoma X que el feto haya heredado de la madre, siempre se va a detectar un desequilibrio en plasma materna, de tal manera que si el feto es afecto el desequilibrio será a favor del alelo mutado y, si el feto es sano el desequilibrio será a favor del alelo silvestre.

La tasa de sensibilidad obtenida en la validación de la técnica de ddPCR para el estudio de las mutaciones de herencia materna ha sido del 96%, el Valor Predictivo Negativo (VPN) del 100 % y el Valor Predictivo Positivo del 97%, habiéndose genotipado correctamente 29/36 casos. Uno de los casos estudiados resultó ser un Falso Positivo (FP) y 6/36 de las muestras restantes no pudieron ser genotipadas. El FP (Control ddPCR 13) no puede atribuirse a un bajo porcentaje de ADN fetal, ya que se había detectado un 21% de ADN fetal a partir del estudio de otro SNP en esa muestra. Una posible explicación a este fenómeno sería una hibridación inespecífica de la sonda complementaria al alelo 2 (VIC) en la región genómica del alelo 1 (FAM), enmascarando así la detección del desequilibrio del alelo silvestre respecto al mutado. De los 6 casos donde no se pudo llegar al genotipo fetal, uno no cumplía los parámetros óptimos de calidad que requiere la técnica de ddPCR (número de eventos menor de 10,000) y los otros cinco casos estaban en la zona gris. Recordemos que la zona gris incluye aquellos casos cuyos valores de *Z-score* están comprendidos entre -1.5 y -2, y 1.5-2, por lo que, según lo establecido en este trabajo, requerirían la recogida de una segunda muestra para posibilitar su diagnóstico. En el estudio de validación no fue posible la recogida de nueva muestra y por ello no se pudo concluir el genotipo fetal en sangre materna. No obstante, en el abordaje de un caso real el protocolo interno establece la recogida de varias muestras, por lo que la tasa diagnóstica de la técnica para el estudio de RMD de mutaciones maternas podría aumentar.

Una vez se determinó el potencial de esta tecnología en el estudio de validación se incluyeron cinco casos para el abordaje de mutación materna; 3/5 (casos 30, 31 y 32) siguiendo un patrón autosómico dominante, 1/5 (caso 33) patrón de herencia recesiva donde ambos progenitores eran portadores de la misma mutación, y 1/5 (caso 34) en el que se había previamente caracterizado, tras la determinación de sexo fetal, como varón donde la madre era portadora de la mutación responsable de una enfermedad ligada al cromosoma X.

Los cinco casos estudiados fueron correctamente diagnosticados. A pesar de ser necesario la inclusión de un mayor número de casos para su abordaje de mutaciones de herencia materna, los resultados obtenidos son prometedores, sin falsos negativos ni positivos, abriendo el campo del DPNI a pacientes que anteriormente no podían acceder a este tipo de estudios no invasivos, y en los que por tanto era necesario recurrir a un DP convencional.

Métodos de estimación del porcentaje de ADN fetal

Recientemente con la incorporación de los test de cribado de las aneuploidias más frecuentes donde la sensibilidad exigida para poder discernir entre un feto euploide y uno con trisomía es muy elevada y debido a la mínima diferencia observada para el establecimiento del ratio entre el cromosoma de interés y un cromosoma de referencia (*RCD-Relative Chromosome Dosage*) (Lo y cols., 2007); la estimación del porcentaje de ADN fetal en la muestra supone un requisito previo para minimizar la tasa de falsos negativos. Publicaciones recientes donde se llevan a cabo estudios de validación en un elevado número de gestantes para el cribado de las aneuploidias más frecuentes estiman que la tasa de resultados fallidos debido a un bajo porcentaje de ADN fetal está en torno al 0.1% (Zhang y cols., 2016). Estos trabajos además apoyan estudios previos que defienden que ciertas características fisiológicas de las gestantes, tales como el índice de masa corporal o la edad materna, están inversamente correlacionado con el porcentaje de ADN fetal en la muestra (Ashoor y cols., 2012; Palomaki y cols., 2001).

En esta tesis, la estimación de la presencia de ADN fetal no se ha propuesto como requisito previo para el abordaje no invasivo de la mutación, sino para descartar un falso negativo especialmente en aquellos casos donde la madre y el feto comparten genotipo (ausencia de la mutación paterna y equilibrio alélico en plasma materno). La técnica analítica empleada para estimar el porcentaje de ADN fetal debe ser la misma que la empleada para el abordaje mutacional o, en su defecto de una sensibilidad menor. En este trabajo se incorporó el estudio de diluciones artificiales de ADN positivo para la mutación en ADN negativo con el fin de establecer el límite de detección de la técnica para la mutación de estudio. En el uso de la técnica de minisequenciación para el estudio de mutaciones paternas, reveló un límite de detección de entre el 2-5%, siguiendo la misma estrategia de diluciones seriadas el límite de detección de la PCR Digital fue del 0,1% (datos no mostrados en el presente trabajo), siendo este incremento en la sensibilidad analítica lo que ha permitido abordar las enfermedades de herencia materna que hasta la fecha no era posible con las técnicas anteriores.

Para la estimación del porcentaje de ADN fetal en gestaciones de feto varón, el estudio del gen *SRY* supone la opción más eficiente ya que su estudio está ampliamente estandarizado (Guibert y cols., 2003; Johnson y cols., 2004; Bustamante-Aragonés y cols., 2008). Esta ha sido la estrategia seguida en este trabajo mediante técnica de minisequenciación en 8 casos y en 2 de los casos estudiados mediante PCR Digital. En todos los casos se observó la presencia de ADN fetal en plasma materno y se puede concluir que la estrategia de estudio del gen *SRY*, con independencia de la técnica analítica empleada, es eficiente para estimar el porcentaje de ADN en estos casos.

Los casos de feto hembra suponen un reto mayor. En este trabajo se han seguido dos estrategias: a) el estudio de SNPs del cromosoma X en la gestante y su pareja y posterior abordaje de los SNPs informativos mediante técnica de minisequenciación, y b) estudio en base a las diferencias de metilación existentes entre madre y feto del gen *RASSF1A/GAPDH* mediante técnica de ddPCR.

Para el estudio de SNPs del cromosoma X se seleccionaron seis SNPs, y se realizó el genotipado previo en 3 parejas con gestaciones de feto hembra (casos 1, 5 y 6), y sólo una de ellas (caso 1) mostró un SNP informativo (madre homocigota vs padre hemocigoto para el alelo contrario) susceptible de ser estudiado posteriormente mediante minisequenciación. Se trataba de un caso del antígeno Kell donde no se detectó el cambio en plasma materno, y se realizó el análisis en multiplex de la mutación y el SNP del X de cara a demostrar la presencia de ADN fetal en la muestra. La presencia del SNP del cromosoma X paterno y la ausencia del alelo (K) del gen *Ke1* validaban el diagnóstico de feto negativo. Sin embargo, se plantea dada la baja informatividad observada en los estudios de genotipado de SNPs del cromosoma X, la búsqueda de un número mayor de SNPs para obtener una informatividad mayor a la obtenida en este trabajo.

El segundo método empleado para la confirmación de la presencia de ADN fetal en fetos hembra ha sido el estudio a partir del gen *RASSF1A* que presenta una diferencia de metilación entre las secuencias materna y fetales, que ha mostrado ser de gran utilidad como marcador universal fetal con independencia del sexo (White y cols., 2012).

Este trabajo apoya estudios previos que consideran el gen *RASSF1A* como método de confirmación universal de la presencia de ADN fetal (Chan y cols., 2006). En esta Tesis solo se ha llevado a cabo su estudio en 4 casos de feto hembra mediante tecnología de ddPCR revelando un porcentaje de ADN fetal entre 2,4 y 10,8%. Datos del laboratorio, no mostrados

en este trabajo, donde se compararon ensayos de *SRY/GAPDH* con *RASSF1A/GAPDH* en la misma muestra, sugirieron una infravaloración del porcentaje de ADN fetal mediante el estudio de *RASSF1A*. Esto puede asociarse a la posibilidad de que secuencias de origen fetal durante el primer trimestre de gestación, no estén aún hipermetiladas y por tanto estén siendo digeridas, generando así a una subestimación del porcentaje real de ADN fetal en la muestra por parte del ensayo de *RASSF1A* (Hindson y cols., 2011). No obstante, sería necesario un estudio más exhaustivo con un número mayor de muestras para poder valorar estos resultados.

Valoración de las diferentes técnicas empleadas para el estudio de enfermedades monogénicas en sangre materna

En el presente trabajo se han comparado diferentes técnicas para el estudio de mutaciones puntuales de herencia paterna y *de novo*, concluyendo que se obtiene con la técnica de minisequenciación un nivel de detección y sensibilidad muy elevado alcanzando un VPP y VPN del 100%. Su tasa de sensibilidad es del 95%, ya que todos los casos estudiados fueron correctamente diagnosticados, excepto un caso donde no se pudo emitir resultado respecto al carácter de portador o no, en relación a la mutación paterna, debido a la presencia de un artefacto en la región de amplificación de la mutación. Ahora bien el abordaje de mutaciones paternas mediante técnica de PCR Digital ha mostrado una tasa de sensibilidad del 100% sin ningún falso positivo ni negativo.

Por tanto ambos métodos, minisequenciación y PCR Digital, son susceptibles de ser empleados para el abordaje de mutaciones paternas en plasma materno. La PCR Digital muestra un nivel de sensibilidad mayor que la técnica de minisequenciación, estableciéndose el límite de detección para la técnica de minisequenciación entre el 2-5%, según han mostrado las diluciones seriadas, y para la PCR Digital del 0.1% (datos no mostrados en el presente trabajo). Estas conclusiones están apoyadas por un estudio recientemente publicado donde se incluyen 26 casos de acondroplasia abordados mediante ambas tecnologías, minisequenciación y PCR Digital, obteniendo un porcentaje mínimo de ADN fetal detectable de 1,5-3% y 0,4-0,8% respectivamente (Orhant y cols., 2016).

Como valor añadido, la PCR Digital no sólo determina la presencia/ausencia de la mutación de origen paterno, sino que refleja indirectamente el porcentaje de ADN fetal presente en la muestra. En el caso del abordaje de mutaciones de herencia materna, la ddPCR

ha mostrado una precisión del 96% en el estudio de validación, y un 100% en el diagnóstico de los casos reales incluidos.

En el caso del abordaje de mutaciones dinámicas, la técnica analítica disponible actualmente en DPNI es la QF-PCR. En este trabajo la tasa de no detección de alelos fetales ha sido elevada tanto para el estudio directo como para el indirecto (30%) dado que son zonas inestables de mayor complejidad analítica, por lo que se propone mejorar los procesos previos de PCR o buscar técnicas alternativas que permitan el estudio de regiones repetidas. En este sentido el menor tamaño de los fragmentos fetales respecto a los de origen materno supone una limitación en caso de grandes expansiones, esta misma característica presente en la muestra materno es lo que sugiere el diseño de amplicones de pequeño tamaño que favorezcan la amplificación de un mayor número de fragmentos fetales. Otro factor a tener en cuenta en el diseño y abordaje de estudios de ADN fetal en plasma materno es incluir el mayor número de réplicas, especialmente en los casos abordados a partir de PCR Digital dado que el valor combinado de todas las réplicas confiere una robustez mayor a los resultados obtenidos.

Impacto clínico del presente trabajo

La aparición de técnicas analíticas cada vez más sensibles está permitiendo implementar nuevos estudios prenatales a partir del ADN fetal presente en plasma materno. Se están abriendo nuevas posibilidades diagnósticas dentro del campo del DPNI haciendo que este abordaje prenatal no invasivo esté cada vez más presente en las unidades de Diagnóstico Prenatal. No obstante aún existen limitaciones técnicas en función de la base molecular de la patología de estudio, considerándose aún un reto el abordaje de DPNI de mutaciones dinámicas de herencia materna o grande deleciones y duplicaciones. No obstante, para seguir solventando las limitaciones y alcanzando nuevos logros es fundamental la recogida del mayor número de casos posible, gracias a la colaboración entre obstetras y genetistas de diferentes centros para poder realizar así una valoración fiable de los nuevos métodos que están emergiendo.

A partir de los resultados obtenidos y, en consecuencia, a los estudios llevados a cabo en esta Tesis se ha diseñado el siguiente algoritmo de actuación futura para los estudios en ADN fetal de Diagnóstico Prenatal No Invasivo de enfermedades monogénicas, en función del tipo de herencia. En el mismo se incluyen los casos en los que sería conveniente una estimación del porcentaje de ADN fetal en la muestra de plasma materno estudiada (*Figura 37*).

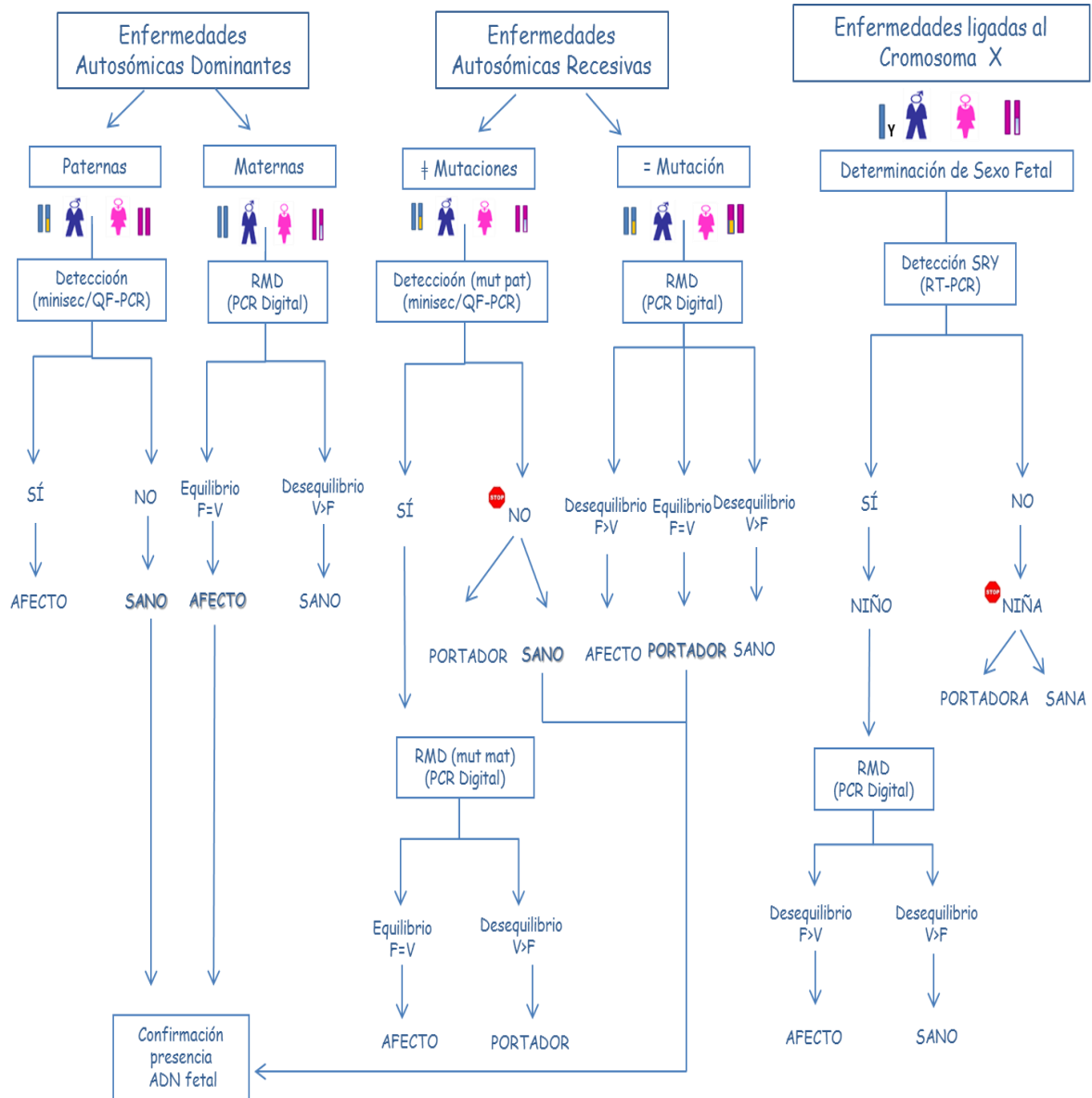


Figura 36. Algoritmo propuesto de actuación futura para los estudios en ADN fetal de Diagnóstico Prenatal No Invasivo de enfermedades monogénicas

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La QF-PCR es actualmente la única técnica de DPNI que permite el diagnóstico de enfermedades causadas por mutaciones dinámicas, pero su aplicación para estudios indirectos presenta una eficacia menor frente al abordaje directo debido a su baja tasa diagnóstica.
- 2) La técnica de minisequenciación ha mostrado tener una alta sensibilidad para el estudio de mutaciones puntuales de origen paterno o *de novo* en sangre materna.
- 3) La puesta a punto de la técnica de PCR Digital mediante SNPs ha permitido mimetizar todos los modelos de herencia de enfermedades monogénicas y con independencia del origen parental.
- 4) El estudio de validación de PCR Digital ha mostrado una elevada tasa de sensibilidad y especificidad.
- 5) La eficacia en los cinco casos reales analizados confirma los resultados previos de validación por PCR Digital, aunque se requiere aumentar el número de estudios para establecer una precisa sensibilidad y especificidad.
- 6) La técnica de PCR Digital permite ampliar el DPNI de enfermedades monogénicas a los casos de herencia materna.
- 7) La estrategia de estimación del porcentaje de ADN fetal en la muestra de plasma materno para evitar falsos negativos, en aquellos casos en los que madre y feto comparten genotipo, es recomendable.
- 8) Entre las estrategias de estimación de presencia de ADN fetal, la estrategia de *SRY* en los casos de feto varón, ha resultado ser la opción más eficaz. La estimación con el gen *RASSF1A* ha mostrado ser una buena opción con independencia del sexo fetal, aunque es necesario ampliar estos estudios a un mayor número de casos.
- 9) Derivado de este trabajo se ha diseñado un algoritmo diagnóstico de DPNI de enfermedades monogénicas, como posible acción futura en el manejo de gestaciones de parejas portadoras de alguna enfermedad mendeliana.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn*. 1997 Dec; 17(13): 1299-311.
- Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45 (1): 16–26.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27: 415-418.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 301-302.
- Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther*. 2012; 31(4):237-43.

B

- Babinszki A, Lapinski RH, Berkowitz RL. Prognostic factors and management in pregnancies complicated with severe kell alloimmunization: experiences of the last 13 years. *Am J Perinatol*. 1998; 15(12): 695-701.
- Barrett AN, Chitty LS. Developing noninvasive diagnosis for single-gene disorders: the role of digital PCR. *Methods Mol Biol*. 2014; 1160: 215-28.
- Bellido ML, Radpour R, Lapaire O, De Bie I, Hösli I, Bitzer J, Hmadcha A, Zhong XY, Holzgreve W. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol Reprod* 2010; 82(4): 745-750.
- Bevis DC. The antenatal prediction of haemolytic disease of the newborn. *Lancet*. 1952; 1(6704): 395-398.
- Bianchi DN, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3279-3283.
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP; Maternal Blood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*. 2012; 119(5): 890-901.
- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem*. 2005; 51(2):312-320.

Brambati B, Simoni G. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 1983; 1:586.

Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Diego-Alvarez D, Riveiro-Alvarez R, Lorda-Sanchez I, Ayuso C, Ramos C. Early noninvasive prenatal detection of a fetal CRB1 mutation causing Leber congenital amaurosis. *Mol Vis*. 2008a; 14: 1388-1394.

Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Diego-Alvarez D, Vallespin E, Plaza J, Ayuso C, Ramos C. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia*. 2008b May; 14(3): 593-8.

Bustamante-Aragónés A, Rodríguez de Alba M, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Díaz-Recasens J, Troyano-Luque J, Ramos C. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene*. 2012; 504(1): 144-149.

C

Campbell S, Johnstone FD, Holt EM, May P. Anencephaly: early ultrasonic diagnosis and active management. *Lancet*. 1972; 2: 1226-1227.

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50:88-92.

Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaidis KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006; 52: 2211-2218.

Chan K, Yam I, Leung KY, Tang M, Chan TK, Chan V. Detection of paternal alleles in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia: a feasibility study in southern Chinese. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 May; 150(1): 28-33.

Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:14753-14758.

Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pajkrt E, et al. New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37: 283–289.

Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, Daniels G, Massey E. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ*. 2014; 349: g5243.

Chitty LS, Mason S, Barrett AN, McKay F, Lench N, Daley R, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: next-generation sequencing

allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. *Prenat Diagn.* 2015; 35(7): 656–662.

Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem.* 2002 May; 48(5): 778-80.

Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol* 2007; 170: 941-950.

Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Clouser C, Lee C, McKernan K, Zhou D, Nicolaides KH, Lo YM. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem.* 2010; 56(3): 459-463.

Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011; 342: c7401.

Chu T, Yeniterzi S, Yatsenko SA, Dunkel M, Rajkovic A, Hogge WA, Peters DG. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological disorders, fetal aneuploidy and constitutional maternal chromosomal mosaicism. *Hum Reprod Update.* 2015 Sep-Oct; 21(5): 690-2.

Covone AE, Mutton D, Johnson PM, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 1984; 2: 841-843.

D

Dancis J. The antepartum diagnosis of genetic diseases. *J Pediatr.* 1968; 72(2): 301-302.

Debrand E, Lykoudi A, Bradshaw E, Allen SK. A Non-Invasive Droplet Digital PCR (ddPCR) Assay to Detect Paternal CFTR Mutations in the Cell-Free Fetal DNA (cffDNA) of Three Pregnancies at Risk of Cystic Fibrosis via Compound Heterozygosity. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142729.

Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959; 78: 960-973.

E

Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, McCullough R, McCarthy E, Nygren AO, Dean J, Tang L, Hutchison D, Lu T, Wang H, Angkachatchai V, Oeth P, Cantor CR, Bombard A, van den Boom D. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by

sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204(3): 205.e1-11.

F

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 16266–16271.

Finning K, Martin P, Soothill P, Avent N. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079-1085.

G

Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet.* 2005 Jul; 117(2-3): 243-8.

Galbiati S, Stenirri S, Sbaiz L, Barberis M, Cremonesi L, Restagno G, Ferrari M. Further considerations concerning non-invasive prenatal diagnosis of craniosynostosis based on the identification of an 18 bp deletion in the TWIST1 gene by COLD-PCR. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(7): e129-30.

Galbiati S, Monguzzi A, Damin F, Soriani N, Passiu M, Castellani C, Natacci F, Curcio C, Seia M, Lalatta F, et al. COLD-PCR and microarray: two independent highly sensitive approaches allowing the identification of fetal paternally inherited mutations in maternal plasma. *J Med Genet* 2016; 53(7):481-487.

Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Costa JM. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(3):666-669.

Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946–948.

González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003 Mar; 23(3): 232-4.

Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Bustamante Aragonés A, Rodriguez de Alba M, Diego Alvarez D, et al. Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 477–481.

Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by Real Time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1733-1736.

Gu W, Koh W, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Hudgins L, Hintz SR, Quake SR. Noninvasive prenatal diagnosis in a fetus at risk for methylmalonic acidemia. *Genet Med* 2014; 16(7):564-567.

H

Hill M, Twiss P, Verhoef TI, Drury S, McKay F, Mason S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenat Diagn.* 2015; 35(10): 950–958.

Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011 Nov 15; 83 (22):8604-10.

Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods.* 2013 Oct;10 (10):1003-1005.

Horowitz I, McDonald AD. Anencephaly and spina bifida in the Province of Quebec. *Can Med Assoc J* 1969; 100:748-755.

Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 2008; 28: 304-308.

J

Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, Bischoff FZ, Hahn S, Sharma A, Dang DX, Hire LM, Bianchi DW, Simpson JL, Holzgreve W, Elias S, Klinger KW. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem.* 2004;50(3): 516-521.

K

Khatab A, Yuen T, Sun L, Yau M, Barhan A, Zaidi M, Lo YM, New MI. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocr Dev.* 2016; 30: 37-41.

Kimura M, Hara M, Itakura A, Sato C, Ikebuchi K, Ishihara O. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. *Nagoya J Med Sci.* 2011; 73(3-4): 129-135.

L

- Laederich MB, Degnin CR, Lunstrum GP, Holden P, Horton WA. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is a strong heat shock protein 90 (Hsp90) client: implications for therapeutic manipulation. *J Biol Chem.* 2011 Jun 3; 286(22): 19597-604.
- Legler TJ, Müller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. *Transfus Med Hemother.* 2009; 36(3):189-198.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37(3):646-650.
- Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn.* 2007 Jan; 27(1): 11-7.
- Lim JH, Kim MJ, Kim SY, Kim HO, Song MJ, Kim MH, Park SY, Yang JH, Ryu HM. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia using circulating fetal DNA in maternal plasma. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28(2): 167-172.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-775.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224.
- Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010; 2(61): 61-91.
- Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2008; 54(10):1664-1672.
- Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(50): 19920-19925.

M

- Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet.* 2002 Jan; 70(1): 257-64.

Meaney C, Norbury G. Noninvasive prenatal diagnosis of early onset primary dystonia I in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2009 Dec;29(13):1218-21.

Moise KJ Jr. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000; 92(1): 75-81.

N

Nadler HL. Antenatal detection of hereditary disorders. *Pediatrics.* 1968; 42(6): 912-918.

Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem.* 2004; 50(4): 694-701.

Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, Rodriguez MH, Williams J 3rd, Mitchell ME, Adair CD, Lee H, Jacobsson B, Tomlinson MW, Oepkes D, Hollemon D, Sparks AB, Oliphant A, Song K. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207(2): 137.e1-8.

O

Orioli IM, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo P. Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet.* 1995 Nov 6;59(2): 209-17.

Orhant L, Anselem O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburgrave N, Tafuri G, Letourneur F, Goffinet F, Allach El Khattabi L, Leturcq F, Bienvenu T, Tsatsaris V, Nectoux J. Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. *Prenat Diagn.* 2016 May;36(5):397-406.

P

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13: 913–920.

Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296–305.

Papantoniou N, Bagiokos V, Agiannitopoulos K, Kolialexi A, Destouni A, Tounta G, Kanavakis E, Antsaklis A, Mavrou A. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn.* 2013; 33(7): 682-687.

Parks M, Court S, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, Williams D, Cole T, MacDonald F, Griffiths M, Allen S. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *Prenat Diagn.* 2016; 36(4): 312-320.

Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, Banjevic M, Sigurjonsson S, Ryan A, Hall MP, Dodd M, Lacroute P, Stosic M, Chopra N, Hunkapiller N, Prosen DE, McAdoo S, Demko Z, Siddiqui A, Hill M, Rabinowitz M. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol.* 2014 Aug; 124: 210-8.

Perlado S, Bustamante-Aragonés A, Donas M, Lorda-Sánchez I, Plaza J, Rodríguez de Alba M. Fetal Genotyping in Maternal Blood by Digital PCR: Towards NIPD of Monogenic Disorders Independently of Parental Origin. *PLoS One.* 2016 Apr 14;11(4):e0153258.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YDM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002; 48:35-41.

R

Ramos C, Recasens JD, Benitez J, Santolaya J, Sanchez Cascos A. Early cytogenetic diagnosis by chorion biopsy. *Rev Clin Esp* 1984; 174: 21-23.

Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jun;47(6):698-704.

Rodríguez de Alba M, Bustamante-Aragonés A, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J, Ramos C. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. *Diagn Prenat.* 2012; 23 (2): 67-75.

S

Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000; 356 :1170

Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn.* 2006; 26:906-16

Schmörl G. Pathologisch-anatomischeuntersuchungen ueber Publerekampsie. Vogel 1893.

Sifikis S, Zaravinos A, Maiz N, Spandidos DA, Nicolaides KH. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Nov;201(5):472.e1-7.

Skirton H, Goldsmith L, Chitty LS. An easy test but a hard decision: ethical issues concerning non-invasive prenatal testing for autosomal recessive disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015 Aug;23(8): 1004-1009.

Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, Pagliano M, Restagno G, Ferrari M, Cremonesi L. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003; 112: 617-618.

Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(4): 319.e1-9.

Steele MW, Breg WR Jr. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet.* 1966; 1(7434): 383-385.

Straver R, Oudejans CB, Sistermans EA, Reinders MJ. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn.* 2016 ; 36(7): 614-621.

Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell.* 1992 Oct 30;71(3):355-7.

T

Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011 Mar 31;117(13): 3684-3691.

Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Development and application of a real-time quantitative PCR for prenatal detection of fetal alpha(0)-thalassemia from maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075: 103-107.

Tungwiwat W, Fucharoen G, Fucharoen S, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Sae-Ung N. Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E-beta-thalassemia. *Transl Res.* 2007 Nov; 150(5): 319-25.

V

Van den Oever JM, Bijlsma EK, Feenstra I. Noninvasive prenatal diagnosis of Huntington disease: detection of the paternally inherited expanded CAG repeat in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2015; 35: 945–949.

Van den Oever JM, van Minderhout IJ, Harteveld CL, den Hollander NS, Bakker E, van der Stoep N, Boon EM. A Novel Targeted Approach for Noninvasive Detection of Paternally Inherited Mutations in Maternal Plasma. *J Mol Diagn.* 2015; 17(5): 590-596

Vaughan JJ, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IA. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med.* 1998; 338(12): 798-803.

W

- Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007; 369(9557): 218-228.
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013; 33(7):662-666.
- Wenk RE, Goldstein P, Felix JK. Kell alloimmunization, hemolytic disease of the newborn, and perinatal management. *Obstet Gynecol*. 1985; 66(4): 473-476.
- Westhoff CM, Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology*. 2004; 20(1): 37-49.
- White HE, Dent CL, Hall VJ, Crolla JA, Chitty LS. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45073.
- Wilkin DJ, Szabo JK, Cameron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, Kaitila I, Loughlin J, Munnich A, Sykes B, Bonaventure J, Francomano CA. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet*. 1998 Sep;63(3):711-6.
- Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012; 120: 227-34.
- Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2012; 5: 476.
- Wulff CB, Gerds TA, Rode L, Ekelund CK, Petersen OB, Tabor A; Danish Fetal Medicine Study Group. Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147,987 singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47(1): 38-44.

Y

- Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, Akolekar R, Leung TY, Go AT, van Vugt JM, Minekawa R, Oudejans CB, Nicolaides KH, Chiu RW, Lo YM. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(23): 8583-8588.

Z

- Zeevi DA, Altarescu G, Weinberg-Shukron A, Zahdeh F, Dinur T, Chicco G, Herskovitz Y, Renbaum P, Elstein D, Levy-Lahad E, Rolfs A, Zimran A. Proof-of-principle rapid

noninvasive prenatal diagnosis of autosomal recessive founder mutations. *J Clin Invest.* 2015; 125(10): 3757-3765.