

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



CffDNA

Técnica y aporte de su uso prenatal

Autores: Andrea González B.
Residente programa obstetricia y ginecología
Tutora: Dra. Catherine Díaz

Introducción

- El descubrimiento de ADN libre fetal en plasma materno (**Cell-free fetal DNA (cfDNA)**) ha abierto un enfoque para el diagnóstico prenatal no invasivo
 - Descubrimiento 1997 → 3% - 6% del ADN libre de células en la sangre materna era de origen fetal impulsó estudios para determinar si el síndrome de Down podía detectarse de forma no invasiva
 - ↑ comercialización drástica desde 2011 en todo el mundo.

Introducción

- cffDNA es producido tanto por la madre como por la unidad feto-placentaria
 - Fragmentos que tienen entre 50-200 pares de bases (pb), que ingresan a la circulación materna
 - Se elimina de la circulación materna poco después del parto



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 Aug 16;350(9076):485-7. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0. PMID: 9274585.

Raj H, Yelne P. Cell-Free Fetal Deoxyribonucleic Acid (cffDNA) Analysis as a Remarkable Method of Non-Invasive Prenatal Screening. Cureus. 2022 Oct 5;14(10):e29965. doi: 10.7759/cureus.29965. PMID: 36381888; PMCID: PMC9642838.

Introducción

- El análisis para aneuploidías autosómicas comunes (T 21, 18 y 13) utilizando técnicas de secuenciación de próxima generación tiene una alta S y E en detección antenatal
 - Aprox 99 % de los embarazos T21 se detectan → VPP de 1 por 1000 o 0,1 %
 - Posible el análisis de trisomías autosómicas distintas de la trisomía 21, 18 y 13; aneuploidía de los cromosomas sexuales; microdeleciones y micro duplicaciones; y trastornos monogénicos
 - Información S y E limitada

Introducción



- **Prueba de screening**

- Un procedimiento invasivo → amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas → cariotipo o microarray
 - Se consideran diagnóstico gold standard y deben ofrecerse a los pacientes que dan positivo en la prueba de cfDNA.

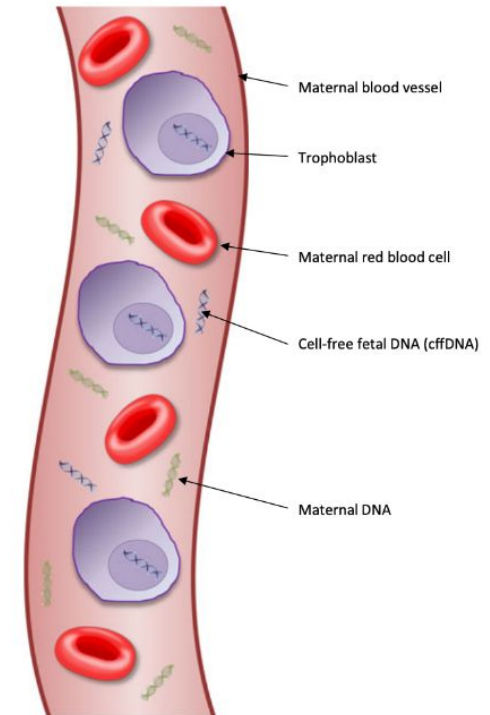


Figure 1. Fragments of cell-free fetal DNA in maternal blood used in noninvasive prenatal testing. Adapted from figure provided by Illumina.

PRENATAL GENETIC TESTING CHART

Related FAQs:

- Prenatal Genetic Screening Tests: www.acog.org/Patients/FAQs/Prenatal-Genetic-Screening-Tests
- Prenatal Genetic Diagnostic Tests: www.acog.org/Patients/FAQs/Prenatal-Genetic-Diagnostic-Tests

These tests can tell you the chances that your unborn baby will have certain genetic disorders.

Screening Tests

First-trimester screening

- Timing: 10–13 weeks
- Blood test plus NT ultrasound exam
- Screens for Down syndrome and trisomy 18

Second-trimester screening ("quad screen")

- Timing: 15–22 weeks
- Blood test
- Screens for Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, and NTDs

Standard ultrasound exam

- Timing: 18–22 weeks
- Screens for some physical defects

Integrated screening and sequential screening

- Timing: 10–22 weeks
- Combines first-trimester and second-trimester screening test results in various ways
- Screens for Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, and NTDs

Cell-free DNA screening

- Timing: 10 weeks and beyond
- Blood test
- Screens for Down syndrome, trisomy 18, and, in some labs, trisomy 13
- The test is more accurate for women at high risk or who have had a positive screening test result

Carrier testing

- Timing: Can be done at any time but is ideally performed before pregnancy
- Tests use blood or tissue sample (tissue from inside the cheek)
- Detects whether you, your partner, or both carry a gene for certain genetic disorders

These tests can tell you whether your baby actually has certain genetic disorders.

Diagnostic Tests

CVS

- Timing: 10–13 weeks
- Tests fetal cells in a sample of chorionic villi
- Detects Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, and inherited disorders for which you request testing but not NTDs

Amniocentesis

- Timing: 15–20 weeks
- Tests fetal cells in a sample of amniotic fluid
- Detects Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, inherited disorders for which you request testing, and certain types of NTDs

Weeks 1–4

Weeks 5–8

Weeks 9–12

Weeks 13–16

Weeks 17–20

Weeks 21–24

Weeks 25–28

Weeks of Pregnancy

Prepregnancy	First Trimester	Second Trimester
--------------	-----------------	------------------

PF51010. Designed as an aid to patients, this document sets forth current information and opinions related to women's health. The information does not dictate an exclusive course of treatment or procedure to be followed and should not be construed as excluding other acceptable methods of practice. Variations, taking into account the needs of the individual patient, resources, and limitations unique to the institution or type of practice, may be appropriate.

Copyright October 2016 by the American College of Obstetricians and Gynecologists. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, posted on the Internet, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission from the publisher.

Abbreviations: CVS, chorionic villus sampling; NT, nuchal translucency; NTD, neural tube defect

Note: Check your local and state laws regarding the timing and availability of prenatal genetic testing.



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS
409 12th Street SW, PO Box 96920
Washington, DC 20090-6920
www.acog.org

Screening Tests

These tests can tell you the chances that your unborn baby will have certain genetic disorders.

First-trimester screening

- Timing: 10–13 weeks
- Blood test plus NT ultrasound exam
- Screens for Down syndrome and trisomy 18

Second-trimester screening ("quad screen")

- Timing: 15–22 weeks
- Blood test
- Screens for Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, and NTDs

Standard ultrasound exam

- Timing: 18–22 weeks
- Screens for some physical defects

Integrated screening and sequential screening

- Timing: 10–22 weeks
- Combines first-trimester and second-trimester screening test results in various ways
- Screens for Down syndrome, trisomy 13, trisomy 18, and NTDs

Cell-free DNA screening

- Timing: 10 weeks and beyond
- Blood test
- Screens for Down syndrome, trisomy 18, and, in some labs, trisomy 13
- The test is more accurate for women at high risk or who have had a positive screening test result

Carrier testing

- Timing: Can be done at any time but is ideally performed before pregnancy
- Tests use blood or tissue sample (tissue from inside the cheek)
- Detects whether you, your partner, or both carry a gene for certain genetic disorders

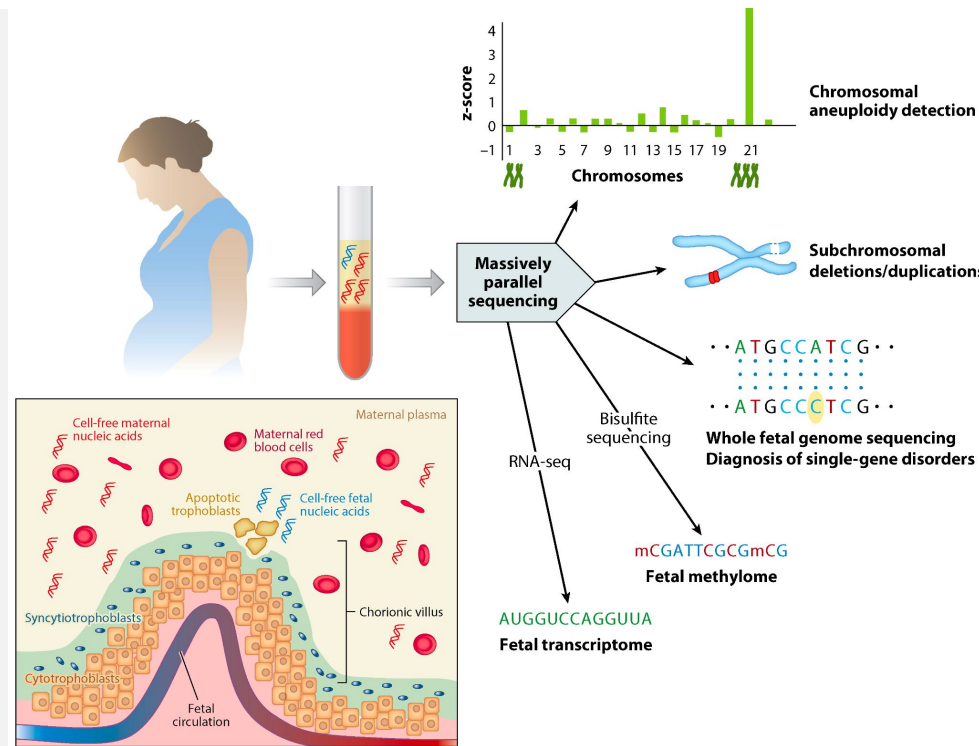


Origen



- Tanto la madre como la unidad feto-placentaria producen cffDNA.

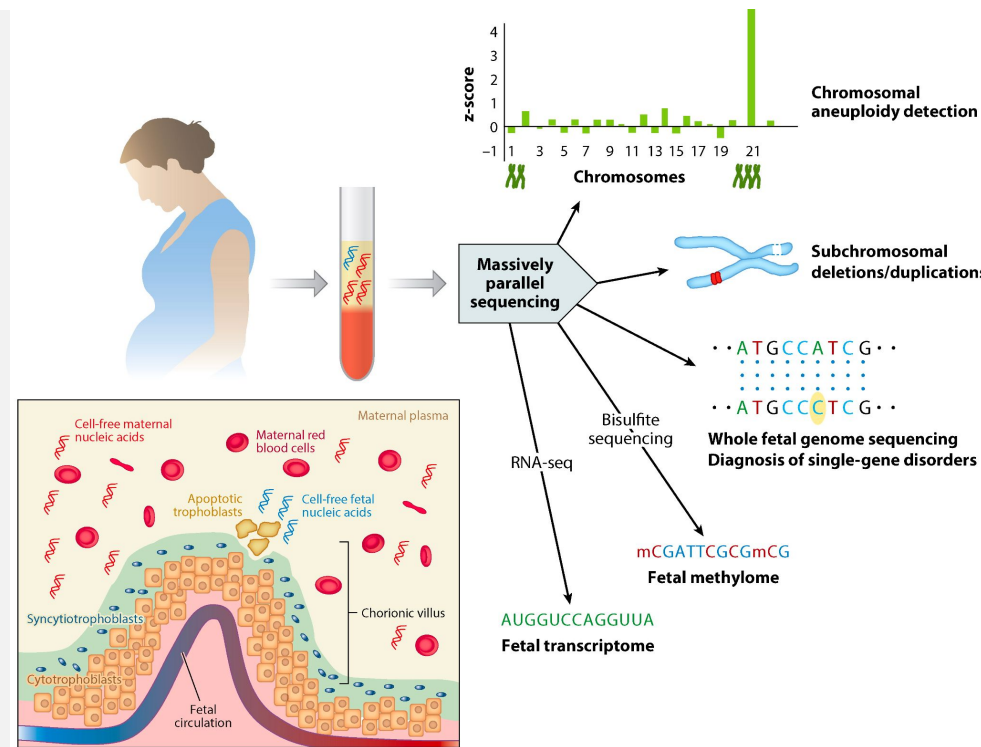
- **Fuente principal**
→ apoptosis de las células placentarias (sincitiotrofoblasto)



Wong FCK, Lo YMD. 2016.
Annu. Rev. Med. 67:419–32

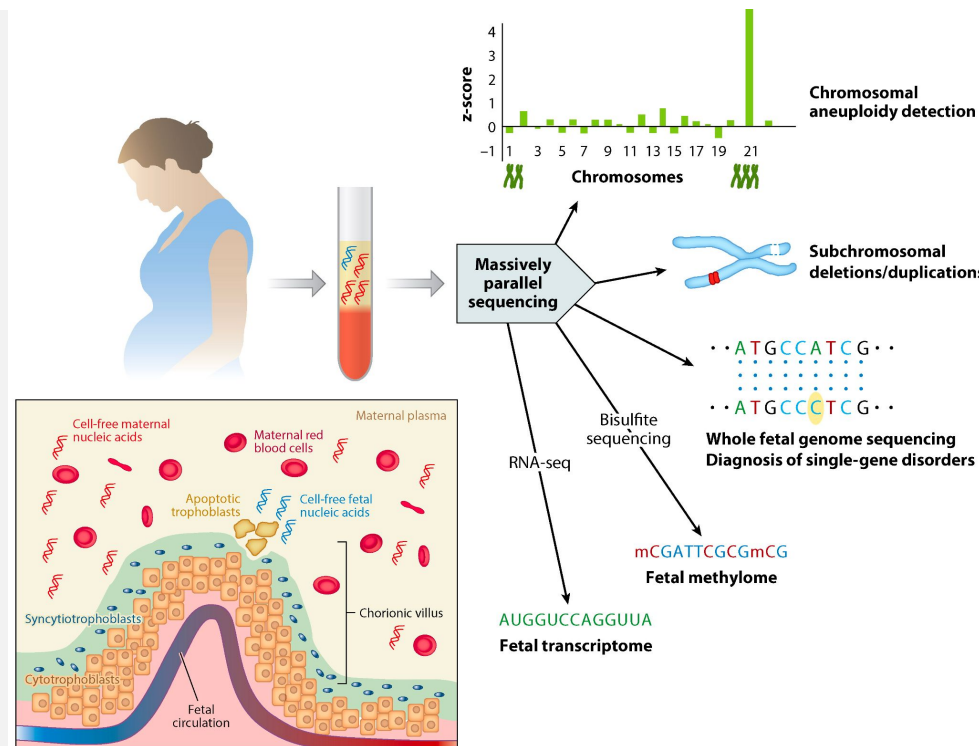
Origen

- Células hematopoyéticas maternas son la fuente de la mayor parte del cfDNA materno
 - Una fuente menor → apoptosis de los eritroblastos fetales que generan cfDNA en la circulación fetal → atravesar la placenta → circulación materna



Origen

- Feto y placenta se originan a partir de un solo óvulo fertilizado
 - Por lo general son genéticamente idénticos, pero las diferencias son fuentes importantes de resultados discordantes en las pruebas → mosaicismo placentario confinado





Origen

- El cffDNA circulante está muy fragmentado.
 - Cada fragmento → 50 y 200 pb.
 - Existe un patrón claro en los tamaños de fragmentación relacionados con la forma en que el ADN se envuelve alrededor de las proteínas histonas para formar nucleosomas.
 - Patrones difieren entre el cfDNA materno y fetal
 - Fragmentos más largos tienen una probabilidad ligeramente mayor de derivar de la madre.
 - Screening → Aneuploidías y fracción fetal



Fracción fetal

- Es el porcentaje de todo el cffDNA en la sangre materna
 - Detección en sangre materna → desde las 5 semanas de gestación → 9 semanas
 - La concentración \uparrow 0,1 % por semana EG 10 - 20 semanas → \uparrow 1 % por semana hasta el término
- Cantidad adecuada de cfDNA fetal-placentario para obtener un resultado fiable.
→ **mínimo del 3-4%**

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 Aug;18(8):1733-6. doi: 10.1093/humrep/deg320. PMID: 12871892.

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 Jul;33(7):662-6. doi: 10.1002/pd.4119. Epub 2013 May 9. PMID: 23553731.

Fracción fetal

- **Causas de una fracción fetal baja**
 - **Edad gestacional temprana**
 - **Recolección muestra subóptima**
 - **Obesidad materna**
 - **Cariotipo fetal**
 - **Menos comunes:**
 - Uso materno de heparina de bajo peso molecular antes de las 20 semanas de gestación
 - Concepción por fecundación in vitro
 - Embarazo gemelar → fracción fetal por feto es menor

Fracción fetal baja



- **Edad gestacional temprana**
 - Sustancialmente más baja antes de las 10 semanas de gestación
 - La mayoría de los laboratorios requieren que los pacientes esperen al menos hasta las 10 semanas de gestación para ayudar a garantizar una fracción fetal adecuada para la prueba.
 - El cffDNA aprox el 11- 13% del total de cfDNA en la circulación materna al final del primer trimestre y principios del segundo
 - Hasta el 50% cerca del término

Fracción fetal baja

- **Recolección muestra subóptima**

- Para solucionar este problema, la muestra debe recolectarse en un tubo con tapa morada (EDTA) y centrifugarse dentro de las seis horas; el plasma resultante es estable con almacenamiento en congelador a -80 °C.
 - Alternativa, utilizar un tubo de recogida de cfDNA especial (p. ej., Cell-Free DNA BCT) que estabiliza la muestra durante un máximo de 5 días a temperatura ambiente → no deben refrigerarse ni congelarse.
- Una extracción de muestra incompleta (p. ej., tubos medio llenos) puede ser rechazada por el laboratorio o puede resultar en una mayor probabilidad de falla de la prueba debido a un volumen de plasma insuficiente para la prueba de cfDNA fetal.

Fracción fetal baja

- **Obesidad materna**

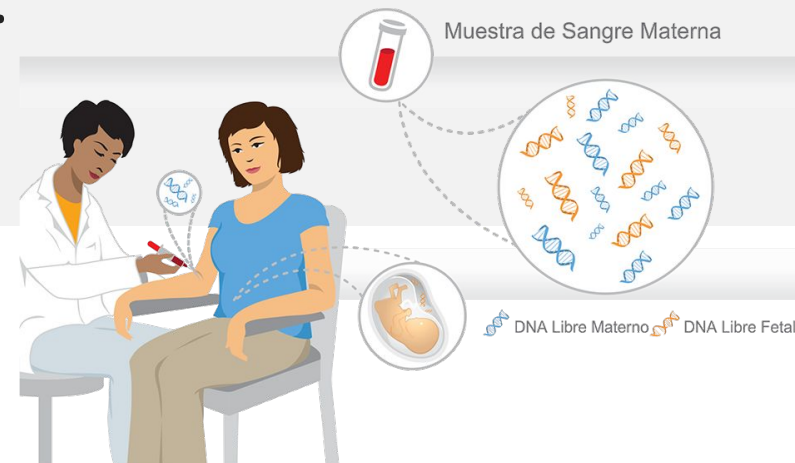
- A medida \uparrow el peso materno \downarrow la fracción fetal
 - Dilución de una cantidad relativamente constante de cfDNA fetal en el mayor volumen de plasma materno + \uparrow cfDNA materno

- **Cariotipo fetal**

- La fracción fetal promedio a las 10 a 20 semanas de gestación es más baja en los embarazos T18
 - 9% v/s feto euploide 11-13% y T21 13-15%
 - Esto puede explicar parcialmente por qué las tasas de detección T21 son más altas que las de la T18, especialmente cuando se consideran las pruebas fallidas.
 - Los fetos triploides tienen fracciones fetales extremadamente bajas, generalmente $<4\%$

Metodología

- Todas requieren obtener al menos una **muestra de sangre materna de 10 ml** utilizando un tubo de recolección específico y suponer preliminarmente que la madre es euploide.
- Algunos métodos examinan el genoma completo, mientras que otros se dirigen a los cromosomas de mayor interés, 21, 18, 13, X e Y.

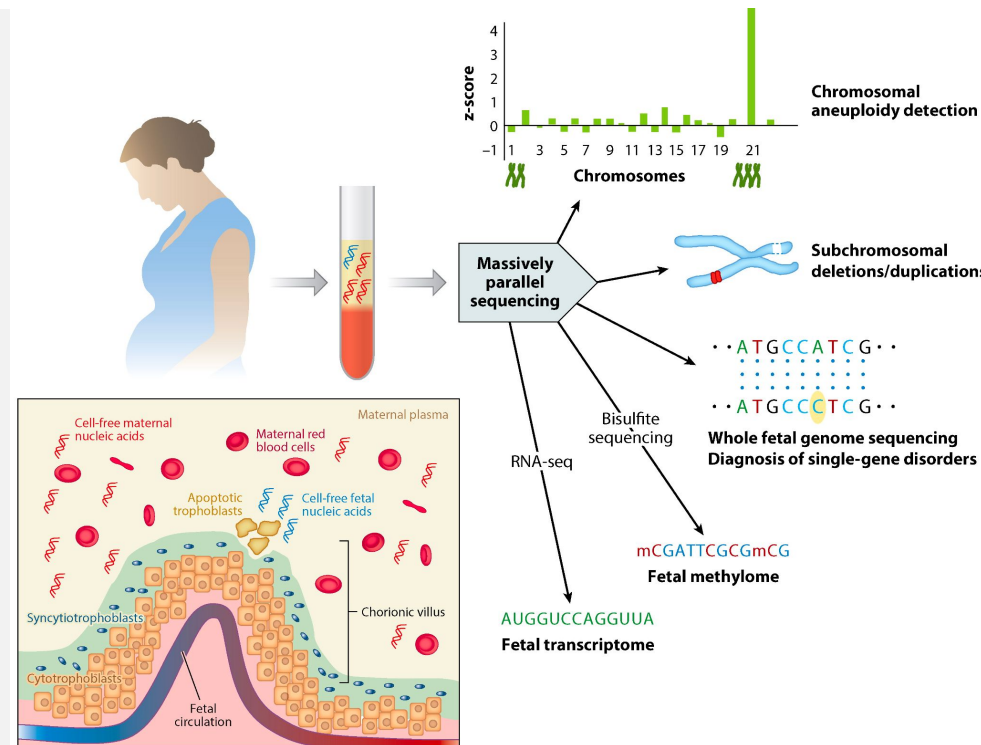


Metodología

- **Secuenciación del genoma completo**
- **Metodologías dirigidas:**
 - Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)
 - Microarrays o micromatrices
 - Replicación en círculo rodante (RCA)

Metodología

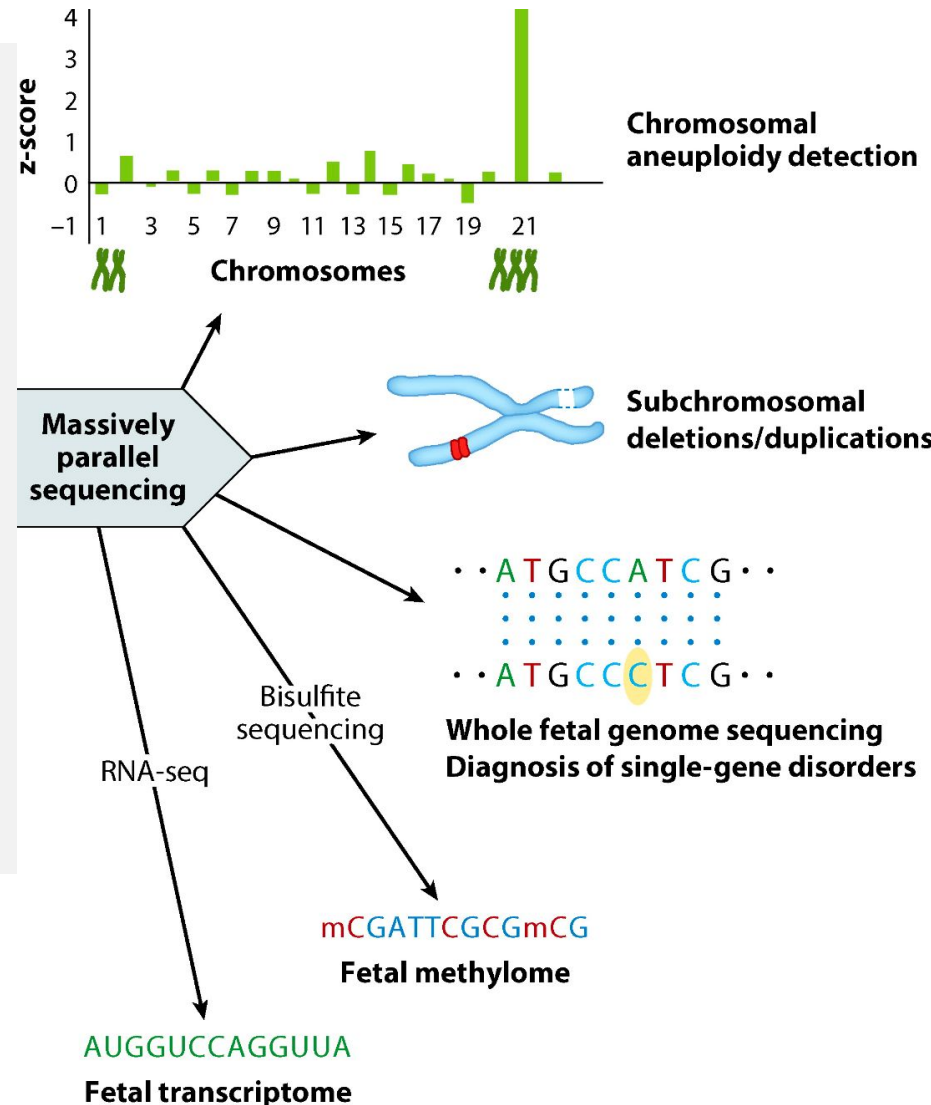
- **Secuenciación del genoma completo**
 - El método más común de cribado de cfDNA secuencia fragmentos de cfDNA en todo el genoma.
 - El cromosoma de origen del fragmento se identifica a través de la alineación con la construcción del genoma humano.



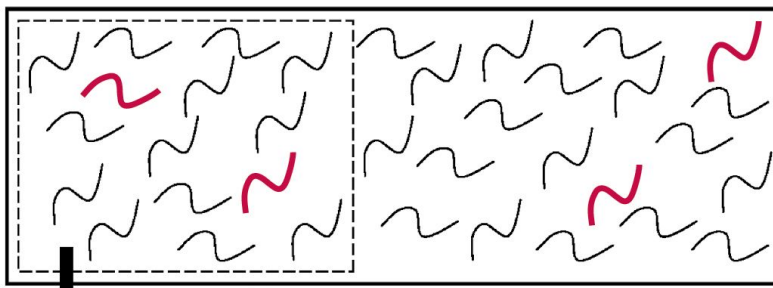
Wong FCK, Lo YMD. 2016. Annu. Rev. Med. 67:419–32

Metodología

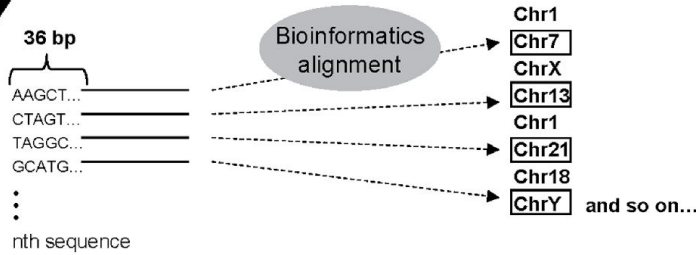
- Mujeres euploides no embarazadas, aproximadamente el 1,3% de los fragmentos de cfDNA se derivan del cromosoma 21.
 - En el embarazo permanece si el feto y la madre sean euploides.
- Sin embargo, **si el feto tiene tres copias del cromosoma 21**, la proporción de fragmentos del cromosoma 21 será ligeramente superior al 1,3% esperado
 - Si el feto tiene trisomía 21 y la fracción fetal es del 10% la proporción esperada por cromosoma será $> 1.365\%$
 - Fracción fetal



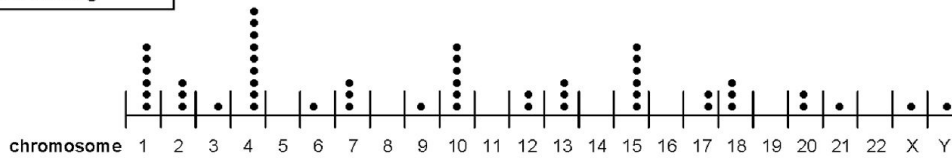
DNA fragments in maternal plasma



Sequence and align



Sequence counting

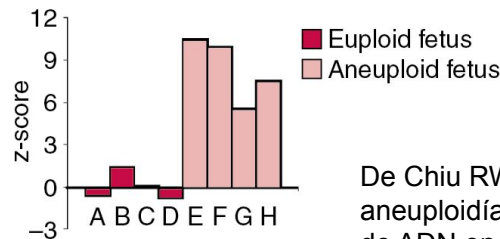


% representation of unique sequences mapped to a chromosome

$$\% \text{ chrN} = \frac{\text{Unique count for chrN}}{\text{Total unique count}}$$

Disease status determination

$$\text{chrN z-score for test sample} = \frac{\% \text{ chrN}_{\text{sample}} - \text{mean } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}{\text{S.D. } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}$$



De Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, et al. Diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidía cromosómica fetal mediante secuenciación genómica paralela masiva de ADN en plasma materno. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20458–63.



Rendimiento Tamizaje

- El rendimiento de la detección se describe mediante:
 - Tasa de detección (DR)
 - Tasa de falsos positivos (FPR).
 - Pequeña proporción de las pruebas de detección de cfDNA no proporciona un resultado clínico utilizable
 - ningún resultado, prueba fallida o ninguna llamada
- **Trisomía 21, 18 y 13**
 - 71 % de todas las anomalías cromosómicas detectadas prenatalmente

Rendimiento Tamizaje

- **Trisomía 21, 18 y 13**

- Rendimiento varía según la trisomía, pero no según la metodología
- Similar en pacientes embarazadas de alto y bajo riesgo

- Trisomía 21 : DR 99,5 %, FPR 0,05 %
- Trisomía 18 : DR 97,7 %, FPR 0,04 %
- Trisomía 13 : DR 96,1 %, FPR 0,06 %

- No tienen en cuenta las fallas de la prueba en muestras aneuploides o normales, y muchos de los estudios incluidos en estos metanálisis no tuvieron un seguimiento completo de todos los embarazos.
 - Probable que estos DR sean una sobreestimación.



Rendimiento Tamizaje

- **Aneuploidías cromosomas sexuales**
 - Las aneuploidías de los cromosomas sexuales son comunes y afectan hasta 1 de cada 400 recién nacidos
 - El rendimiento es lo suficientemente preciso como para ofrecerse con la detección de aneuploidías autosómicas con asesoramiento y consentimiento específicos previos a la prueba

Rendimiento Tamizaje

- **Aneuploidías cromosomas sexuales**
 - **45,X:** S 98,8 % (IC 95 % 94,6-100), E 99,4 % (IC 95 % 98,7-99,9), VPP 14,5 % (IC 95 % 7,0-43,8)
 - **47,XXX:** S 100 % (IC 95 % 96,9-100), E 99,9 % (IC 95 % 99,7-100), VPP 61,6 % (IC 95 % 37,6-95,4)
 - **47,XYY:** S 100 % (IC 95 % 91,3-100), E 100 % (IC 95 % 100-100), VPP 100 % (IC 95 % 76,5-100)
- Los análisis no incluyeron los resultados de las pruebas de cfDNA fallidas en las estimaciones de rendimiento calculadas
-
- Varios de los estudios incluidos no lograron producir un resultado en embarazos con una aneuploidía de cromosomas sexuales conocida → tasas de detección reportadas sobreestimadas.

Rendimiento Tamizaje

- **Anomalías genéticas distintas de las aneuploidías comunes**
 - Microdelección y duplicación: Síndrome de microdelección 22q11.2, síndrome de Angelman, síndrome de Cri-du-chat, síndrome de delección 1p36 y síndrome de Prader-Willi
 - Limitaciones para la detección
 - Muchos laboratorios no pueden identificar los desequilibrios cromosómicos que tienen un tamaño de <5 a 7 Mb
 - » 70%
 - » Más común es 22q11.2 → 85% tienen una delección de 2,54 Mb

Rendimiento Tamizaje

- **Anomalías genéticas distintas de las aneuploidías comunes**
 - Microdelección y duplicación
 - Asociación con discapacidades y retrasos del neurodesarrollo
 - Se distribuyen por todo el genoma y no están necesariamente asociadas con la edad materna.
 - **S 66-86%, E 98,0-99,8%, VPP 31-45%**
 - Los autores consideraron que estaba sobreestimado debido a la línea de base riesgo de cohorte

Rendimiento Tamizaje

- **Anomalías genéticas distintas de las aneuploidías comunes**
 - Enfermedades monogénicas
 - >2300 trastornos gen único tienen una causa molecular identificable conocida
 - Embarazo de riesgo → dg pruebas invasivas
 - Contexto → estado de portador parental conocido o en el contexto de hallazgos ecográficos sospechosos → displasia esquelética.
 - Se ha descrito detección de trastornos ligados al sexo (distrofia muscular de Duchenne/Becker), trastornos autosómicos dominantes (acondroplasia) y trastornos autosómicos recesivos (fibrosis quística)

Rendimiento Tamizaje

- **Anomalías genéticas distintas de las aneuploidías comunes**
 - Enfermedades monogénicas: trastornos autosómicos dominantes
 - Estudios pequeños; S 96%, E 100% según el estudio y el trastorno evaluado
 - síndromes de craneosinostosis y trastornos del espectro de Noonan

Rendimiento Tamizaje

- **Anomalías genéticas distintas de las aneuploidías comunes**
 - Trisomías autosómicas raras:
 - Son raras, presentes en $<0.1\%$ RN
 - Las más comunes son las trisomías 7, 15, 16 y 22
 - No está clara la utilidad clínica
 - Alto riesgo aborto espontáneo
 - 97% detectado por estudio vellosidades coriales parecían ser mosaicismo placentario confinado

Rendimiento Tamizaje

- **Falsos positivos**

- Aunque el VPP para la detección de cfDNA para las trisomías autosómicas comunes es de aprox 90% → significa que el 10 % (+) no tendrán un embarazo afectado

Mosaicismo placentario confinado	Gemelo fallecido	Mosaicismo materno
Cáncer materno	Variantes del número de copias maternas	Receptor de trasplante
Transfusión de sangre reciente	Oportunidad	Problemas técnicos



Falsos positivos

- **Mosaicismo placentario confinado**
 - Fuente principal de cfDNA "fetal" en la circulación materna son las células placentarias
 - puede ser discordante con el tejido fetal.
 - En estos casos, la prueba de cfDNA es analíticamente correcta pero clínicamente incorrecta.
 - 1 o 2% de los embarazos
 - es más probable con la monosomía X y la trisomía 13 que con la trisomía 21 o 18

Falsos positivos

- **Gemelo fallecido**
 - Un gemelo fallecido puede causar una FPR → Si aneuploide
 - Placenta del gemelo fallecido todavía está presente en el momento de la prueba y continúa arrojando ADN semanas después de la muerte.
 - Se ha detectado cffDNA del feto muerto durante 8 a 13 semanas
 - 16 semanas después de una muerte fetal en el segundo trimestre

Falsos positivos



- **Mosaicismo materno**

- La mayoría de los métodos de prueba de cfDNA asumen que la madre tiene un cariotipo normal
- Con el avance de la edad, una proporción cada vez mayor de mujeres embarazadas tiene un pequeño porcentaje de células que han perdido un cromosoma X, y esto puede dar lugar a un resultado de cfDNA falso positivo para los laboratorios que notifican aneuploidías de los cromosomas sexuales



Falsos positivos

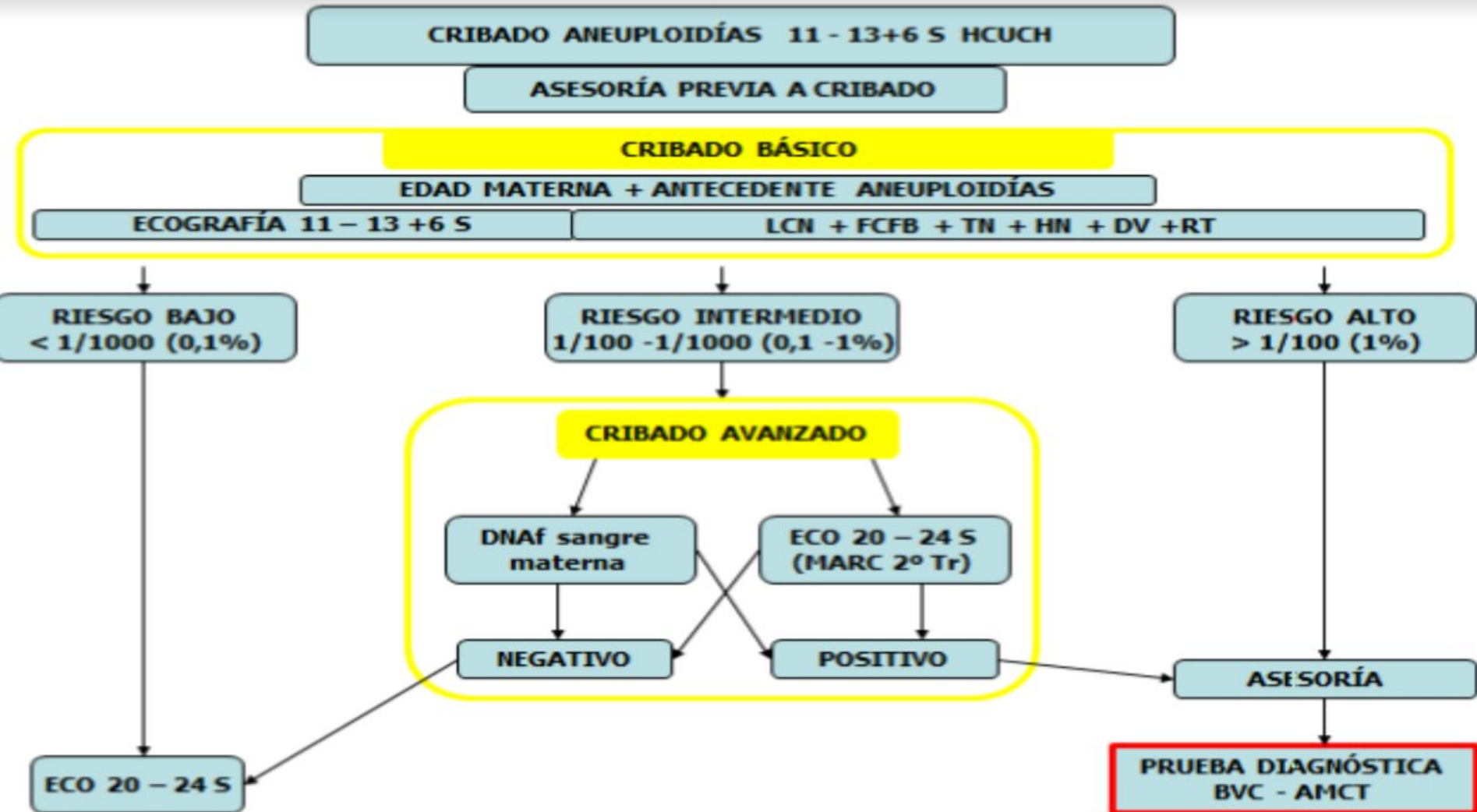
- **Cáncer materno**
 - Pueden arrojar cantidades mensurables de ADN tumoral libre de células a la circulación.
 - El ADN fetal libre de células, el ADN materno libre de células y el ADN tumoral libre de células contribuyen al cfDNA total.
 - Aneuploidía inusual (p. ej., monosomía y trisomía concurrentes) o ganancias y pérdidas subcromosómicas en múltiples cromosomas



Rol clínico

- Evaluación del sexo fetal para el manejo de enfermedades asociadas al sexo fetal.
- Genotipado fetal RHD para el manejo de la incompatibilidad rhesus D.
- Detección de aneuploidías cromosómicas fetales
→ trisomías 21, 13 y 18.
- Detección de enfermedades fetales de un solo gen, incluidas las enfermedades autosómicas dominantes transmitidas por vía paterna o materna, las enfermedades autosómicas recesivas y las enfermedades ligadas al sexo.

Rol clínico



Conclusiones

- cffDNA en la circulación materna → fuente confiable y no invasiva de material genético fetal.
- El conocimiento sobre sus propiedades biológicas se ha traducido en información útil para guiar el diseño de los enfoques analíticos y preanalíticos relevantes para el análisis de cffDNA.
- El análisis cffDNA es útil para la evaluación prenatal de aneuploidías cromosómicas fetales y enfermedades genéticas.

Conclusiones



- Su efectividad en algunas de estas áreas ha llevado a una reducción importante en el número de amniocentesis realizadas en todo el mundo.
- El análisis cffDNA tiene el potencial de detallar todo el genoma fetal de forma no invasiva antes del nacimiento
- Gran cantidad de información prenatal plantea preocupaciones potenciales y ha estimulado el interés de la investigación en el estudio de los aspectos éticos, legales y queda por ver cómo seguirán desarrollándose.

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



CffDNA

Técnica y aporte de su uso prenatal

Autores: Andrea González B.
Residente programa obstetricia y ginecología

Tutora: Dra. Catherine Díaz