

ADN LIBRE FETAL – APLICACIONES CLÍNICAS EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL

Resumen.-

El ADN libre fetal ha sido descubierto hace más de una década y desde entonces las investigaciones han sido encaminadas a descubrir su origen, cómo es metabolizado por la madre y cómo utilizar la información que contiene para fines de diagnóstico clínico. Algunas de estas preguntas han sido respondidas y otras, en cambio, están aún en plena investigación. Las aplicaciones clínicas descritas hasta el momento incluyen el uso del ADN libre fetal como herramienta en la predicción de futuras complicaciones en el embarazo, el conocimiento del sexo del feto en el primer trimestre de gestación y el diagnóstico de enfermedades monogénicas. El objetivo de la presente revisión es dar a conocer cuáles son los alcances que el ADN libre fetal tiene en el diagnóstico genético prenatal.

PALABRAS CLAVE: ADN libre fetal, Diagnóstico genético prenatal, Enfermedades monogénicas.

Luis Guzmán^{1,2}

1 ADN Diagnóstico & Reprogenetics Latinoamérica.

2 Laboratorio de Fisiología de la Reproducción. Facultad de Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Correspondencia

E-mail: lguzman@reprogenetics.com

Dirección: Calle Aricota 106. Of 202. Chacarrilla – Santiago de Surco.

Rev Per Ginecol Obstet. 2008;54:185-189.

Free fetal DNA – Clinical applications in prenatal diagnosis

ABSTRACT

Free fetal DNA (ffDNA) was discovered over a decade ago and since research has been focused in discovering its origin, how the mother metabolizes it and how to use the information that it contains for clinical diagnosis. Some of these questions have been answered; however, more research is needed. Currently, clinical applications include use of ffDNA as a tool in sex determination of the baby during the first trimester, in the prediction of future pregnancy complications, and in the diagnosis of monogenic diseases. The aim of this article is to provide an overview of current ffDNA applications in prenatal genetic diagnosis.

Key words: Free fetal DNA, Prenatal genetic diagnosis, Monogenic disease.

INTRODUCCIÓN

La existencia de células fetales circulando en el torrente sanguíneo materno fue comunicada hace muchos años por Douglas y col. ⁽¹⁾. Además, Walknowsaka y col. ⁽²⁾ publicaron por primera vez la presencia de linfocitos

fetales en metafase en la sangre de mujeres gestantes con embarazos masculinos. Consistente con estos resultados, la biología molecular ha logrado la amplificación específica de secuencias de ADN fetal a partir de componentes celulares de la madre gestante ^(3,4). El descubrimiento de ADN libre fetal (del inglés, *free fetal DNA*) en plasma materno ha marcado una revolución en el campo del diagnóstico genético prenatal, dando paso a nuevas aplicaciones clínicas, como la genotipificación del genotipo Rhesus D, diagnósticos de desórdenes de un solo gen (enfermedades monogénicas) y la determinación del sexo fetal durante el primer trimestre de embarazo.

Origen del ADN libre fetal

El conocer el origen del ADN libre fetal puede ayudar a interpretar las

complicaciones en el embarazo y los mecanismos fisiopatológicos que las causan. Dos hipótesis han sido manejadas acerca de su origen primario: 1) células fetales hematopoyéticas; y, 2) células apoptóticas del trofoblasto, con la subsecuente liberación de ADN.

La frecuencia baja de células hematopoyéticas de origen fetal circulantes encontradas en el torrente sanguíneo materno indica que es poco probable que estas sean la fuente principal del ADN libre fetal, el cual se encuentra en concentración relativamente alta. Además, se ha determinado que en embarazos anembrionados (caracterizados por el desarrollo del saco y placenta, con la ausencia de un polo embrionario, durante el primer trimestre de gestación intrauterina), de nueve embarazos analizados, 5 correspondían a fetos



masculinos y que el promedio del número de copias del gen analizado no presentó diferencias significativas respecto al grupo control de embarazos normales (promedio de 148,3 copias/mL) ⁽⁵⁾. También, se ha detectado la presencia de una secuencia no metilada del gen *maspin* (que se encuentra no metilado en el tejido placentario), en el plasma materno ⁽⁶⁾. Por lo tanto, el tejido placentario sería la principal fuente del ADN libre fetal circulante.

Cinética de la concentración de ADN libre fetal en mujeres gestantes

Lo y col. ^(7, 8) estimaron que 3,4% de total de ADN de plasma materno es de origen fetal, en un rango de 0,39 a 11,7%. La detección temprana del ADN libre fetal se ha realizado a partir de la quinta semana de gestación ⁽⁹⁾, aunque en concentraciones muy bajas y solo en algunas pacientes. La detección, con una sensibilidad de 95%, se da a partir de la décima semana, ya que la concentración aumenta con el tiempo de gestación ⁽¹⁰⁾. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

La concentración de ADN libre fetal disminuye a niveles no detectables, en promedio, a las 2 horas después de los nacimientos por cesárea ⁽¹⁰⁾, mientras que, en mujeres que experimentan un trabajo de parto natural, el ADN libre fetal es detectable hasta 1 o 2 días después del parto ⁽¹¹⁾. La limitación de datos y estudios publicados no permite explicar la diferencia en la desaparición del ADN libre fetal entre ambos grupos, pero se postula que un trabajo de parto causa un incremento en el ADN libre fetal desde el trofoblasto. Este incremento

es posiblemente mediado por las contracciones hipóxicas inducidas en la interfase materno-placenta, en el útero, y se correlaciona con estudios *in vitro* de vellosidades de la placenta que, bajo condiciones de hipoxia, experimentan apoptosis, permitiendo el incremento del ADN libre fetal ⁽¹²⁾. Así, el propio traumatismo mecánico del nacimiento y la hipoxia podrían contribuir a la diferencia en la cantidad de ADN libre fetal encontrado.

Los estudios realizados en animales sugieren que el ADN libre fetal es degradado por nucleasas del plasma sanguíneo, y posteriormente metabolizado en el hígado, riñón y bazo. Además, se ha observado que las pacientes con hígados grasos presentan una prolongada persistencia del ADN libre fetal ⁽¹³⁾.

ADN libre fetal como marcador molecular de preeclampsia

La preeclampsia es definida como hipertensión gestacional (presión sistólica >140 mm Hg o presión diastólica >90 mm Hg, en al menos 2 ocasiones, después de las 20 semanas de embarazo) con proteinuria (>0,3 g/día). Estas características fisiológicas son causadas por mediadores de inflamación o toxinas que secreta la placenta implantada poco profundamente y que actúan en el endotelio vascular, tornándolo en un medio hipóxico. De ser severa, la preeclampsia progresa a preeclampsia fulminante, con cefaleas, trastornos visuales, dolor epigástrico y desarrollo del síndrome de Hellp (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, plaquetopenia) y eclampsia. El desprendimiento prematuro de la placenta se asocia también con embarazos hipertensivos.

La preeclampsia suele ser asintomática, pero la eclampsia es potencialmente letal, por lo que su detección es materia de investigación. Por ahora, el diagnóstico depende de la coincidencia de varias características preclámpticas, siendo evidencia conclusiva el que se alivie con el alumbramiento. En algunas mujeres, aparece una elevación de la presión arterial sin la proteinuria, situación conocida como hipertensión inducida por el embarazo o hipertensión gestacional. Tanto la preeclampsia como la hipertensión gestacional son condiciones serias que requieren el monitoreo tanto del bebé como de la madre.

Estudios realizados para investigar la concentración del ADN libre fetal en mujeres con síntomas de preeclampsia ⁽¹⁴⁾, usaron como marcador el gen β -globina, el cual permite cuantificar el ADN de la madre y del feto de ambos sexos (hasta ese entonces se había comunicado el aumento de la concentración de ADN libre fetal solo en embarazos masculinos ⁽¹⁵⁾. La concentración de β -globina en el plasma sanguíneo de la madre con embarazos normales aumenta con el progreso de la gestación; sin embargo, en mujeres con preeclampsia y 35,6 \pm 2,78 semanas de gestación, la concentración de β -globina es 4 veces mayor, y es 5 veces mayor en mujeres con crecimiento intrauterino restringido. Estos resultados concuerdan con estudios posteriores ⁽¹⁶⁾, en los que se aisló ARNm del plasma sanguíneo de mujeres gestantes y se amplificó los genes marcadores. Se encontró que los genes de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), gen placenta específico 1 y selectina-P, se sobreexpresan en mujeres con preeclampsia. La fuente de estos incrementos no



es clara aún. Sin embargo, se postula que la placenta implantada poco profundamente liberaría factores, como citoquinas, causando daño en las células vasculares maternas; esto añadido a las condiciones de hipoxia que causa la apoptosis de las propias células placentarias, conlleva a la liberación de una mayor cantidad de ADN de origen fetal y ARNm al torrente sanguíneo materno.

De esta manera, el ADN libre fetal es un marcador molecular que podría ser utilizado en el diagnóstico de preclampsia en mujeres gestantes.

Diagnóstico de enfermedades monogénicas

El ADN libre fetal circulante en el torrente sanguíneo de la madre gestante puede también ser utilizado en el diagnóstico de desórdenes de un solo gen (enfermedades monogénicas). Saker⁽¹⁷⁾ realizó estudios en 12 pacientes que acarreaban la mutación $\Delta F508$ (mutación presente en 70% de los casos de fibrosis quística) y usó marcadores STR ligados al punto de la mutación, con el objetivo de determinar el origen del ADN (proveniente de la madre o del feto) y de eliminar el ADO (*allele drop-out*) en el estudio del genotipo; de esta manera, detectaron 1 niño afectado, 7 heterocigotos y 4 niños homocigotos sanos, siendo todos los resultados confirmados en muestras de vellosidades coriónicas.

Además, en la actualidad, se ha descrito diagnósticos prenatales de desórdenes ligados al cromosoma X (18), β talasemias⁽¹⁹⁾, hiperplasia adrenal congénita (20), genotipificación del genotipo Rhesus D del feto y establecimiento de la terapia respectiva⁽²¹⁾, entre otros.

De esta forma, se demuestra que el ADN libre fetal permite diagnosticar

y estudiar diferentes mutaciones puntuales, sin la necesidad de realizar procedimientos invasivos, que pongan en riesgo la salud de la madre o del niño.

Conclusiones

Si bien aún está en discusión el uso del ADN libre fetal como marcador de aneuploidías, existe el consenso de que fetos que acarrean trisomía 21 tienen aumentado el nivel de ADN libre fetal en el plasma sanguíneo de la madre y que esta diferencia no es significativa cuando se usa suero sanguíneo⁽²²⁾. Además, las mujeres gestantes fumadoras tienen 3 veces más altos los niveles de ADN libre fetal, causado probablemente por el estrés oxidativo propio del acto⁽²³⁾.

El ADN libre fetal se presenta como una nueva herramienta disponible para el diagnóstico genético prenatal, con aplicaciones clínicas, como la genotipificación del genotipo Rhesus D, diagnóstico de enfermedades mono-

génicas, diagnóstico de preclampsia y la determinación del sexo fetal durante el primer trimestre de embarazo.

Agradecimientos

Agradezco a Flor Vásquez y Guillermo Llerena por la revisión exhaustiva del presente manuscrito.

PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es un método que permite la amplificación o la creación de múltiples copias del fragmento de ADN que se quiere estudiar. En el caso de la búsqueda del sexo fetal en sangre materna, se trata de amplificar fragmentos del cromosoma Y, marcarlos con un colorante y cuantificar la fluorescencia emitida por el colorante. La PCR en tiempo real se usa en otras áreas de medicina para medir la carga viral, detectar agentes infecciosos, verificar la expresión de ciertos genes, controlar la eficacia de fármacos, entre otros.



Figura 1. Equipo PCR en tiempo real.

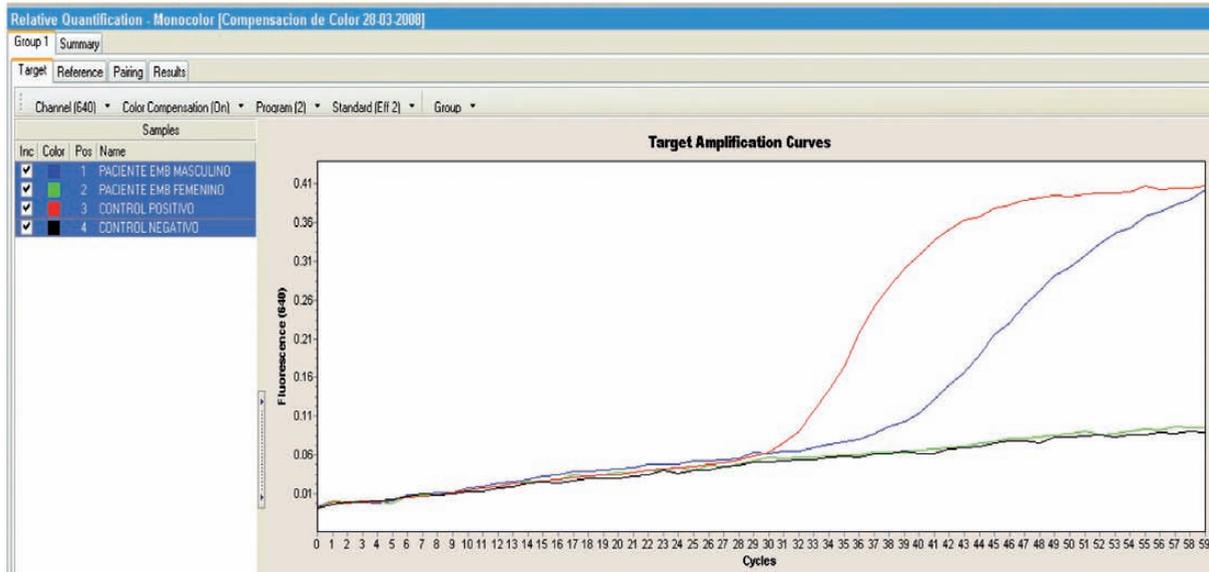


Figura 2. Representación gráfica del resultado de PCR en tiempo real para sexo fetal. El eje Y mide la luz de onda emitida por el colorante. El eje X muestra el número de ciclos (o veces que se amplifica el ADN). La línea roja representa al control positivo masculino. La línea negra se refiere al control positivo femenino. La línea azul corresponde al ADN de un embrión que tiene genes del cromosoma Y; por lo tanto, es varón. La línea verde pertenece al ADN de un embrión femenino que carece de genes Y. Fuente: ADN Diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblasts circulating in the blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1959;58:960-73.
2. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969;1:1119-22.
3. Lo YM, Wainscot JS, Gilmer MDG. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1989;2:1363-5.
4. Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E. 1990. Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood.* 1990;75:2102-6.
5. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattach S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblasts. *Prenat Diagn.* 2007;27:415-8.
6. Chim S, Tong Y, Chiu R. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 2005;102:14753-8.
7. Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet.* 1990;335:1463-4.
8. Lo YM, Tein MS, Lau TK. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:768-75.
9. Rijnders RJ, Luijt VD, Peters ED, Goeree JK, Van Der Schoot JK, Ploos JK, Amstel V, Christiaens GC. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003;23:1042-4.
10. 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;64:218-24.
11. Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn.* 2008;28:304-8.
12. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *Am J Pathol.* 2006;169:400-4.
13. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang.* 2001;80:112-6.
14. Sekizawa A, Farina A, Koide K, Iwasaki M, Honma S, Ichizuka K, Saito H, Okai T. β -globin DNA in maternal plasma as a molecular marker of pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2004;24:697-700.
15. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain P, Rai V, Sargent I, Redman C, Wainscoat J. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
16. Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Okazaki S, Nakamura M, Samura O, Fujito N, Okai T. Cell-free mRNA concentration of CRH, PLAC1, and selectin-P are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Prenat Diagn.* 2007;27:772-7.
17. Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Genetic characterization of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn.* 2006;26:906-16.
18. Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med.* 2002;346:1502.
19. Chiu RW, Lau TK, Cheung T, Gong Z, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem.* 2002;48:778-80.
20. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC,



- Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta-thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*. 2002;360:998-1000.
21. Grootkerk-Tax M, Soussan A, de Haas M, Maaskant-van P, Schoot E. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*. 2006;46:2142-8.
22. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. Quantification of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet*. 2001;108:123-7.
23. Urato A, Peter I, Canick J, Lambert-Messerlian G, Pulkkinen A, Knight G, Jeong YJ, Johnson K, Bianchi D. Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenat Diagn*. 2008;28:186-90.