

EFICACIA DEL DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO POR CÉLULAS FETALES LIBRES EN SANGRE MATERNA 1990-2014. REVISIÓN SISTEMÁTICA

*Trabajo de Grado
Especialización Epidemiología*

*Autores:
Dr. María del Rosario Forero Isaza
Dr. Ana María Pérez Zauner
Dr. Nicole Valderrama Beltrán
Tutor: Dra. Jenny Amaya Amaya
Docente: Dr. Carlos Trillos*

*Universidad Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario
Universidad CES
Bogotá, 2014*

CURRICULUM AUTORES:

MARÍA DEL ROSARIO FORERO ISAZA

Información General:

Documento de Identidad: 51.862.942

Teléfono: 312-3053049

E-mail: forero.maria@urosario.edu.co

Estudios Realizados:

Postgrados:

Universidad Militar Nueva Granada

Especialización Oftalmología

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario- Universidad CES

Estudiante Especialización Epidemiología. 2014. Bogotá.

Pregrado:

Universidad Militar Nueva Granada

Médico Cirujano

ANA MARÍA PÉREZ ZAUNER

Información General:

Documento de Identidad: 53.068.417

Teléfono: 320-9162570

E-mail: perez.ana@urosario.edu.co

Estudios Realizados:

Postgrados:

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario

Estudiante Maestría Genética Humana

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario- Universidad CES

Estudiante Especialización Epidemiología. 2014. Bogotá.

Pregrado:

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario

Médico Cirujano

NICOLE VALDERRAMA BELTRÁN

Información General:

Documento de Identidad:

Teléfono:

E-mail: Valderrama.beltran@urosario.edu.co

Estudios Realizados:

Postgrados:

Universidad del Bosque

Estudiante Especialización Dermatología

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario- Universidad CES

Estudiante Especialización Epidemiología. 2014. Bogotá.

Pregrado:

Universidad del Bosque

Médico Cirujano

ENTIDADES PARTICIPANTES Y AGRADECIMIENTOS

Institución:

Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario.

Facultad de Medicina

Departamento de Epidemiología.

Universidad CES

Facultad de Medicina

Departamento de Epidemiología.

Los autores expresan sus agradecimientos a:

JENNY CAROLINA AMAYA, MD, Esp, MsC (e), PhD (e)

Epidemióloga, Profesora Auxiliar de Carrera

Estudiante Máster en Enfermedades Autoinmunes

Estudiante Doctorado Ciencias Biomédicas

Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes - CREA

Universidad del Rosario.

CARLOS ENRIQUE TRILLOS PEÑA, MD, MsC

Médico Universidad Javeriana. Especialista Gerencia de Servicios de Salud, Universidad Jorge Tadeo Lozano. Especialista en Epidemiología. Universidad del Rosario – Universidad CES. Especialista Gerencia en Salud Ocupacional, Universidad del Rosario – Universidad CES. Magíster en Epidemiología, Universidad CES.

Por brindar asesorías académicas durante la realización del proyecto.

Contenido

CURRICULUM AUTORES:	2
ENTIDADES PARTICIPANTES Y AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
GLOSARIO.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
JUSTIFICACIÓN	11
PROBLEMA.....	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
PREGUNTA PRINCIPAL:	15
PREGUNTAS SECUNDARIAS:.....	15
MARCO TEÓRICO	16
PROPÓSITOS.....	19
OBJETIVOS	20
GENERAL	20
ESPECÍFICOS.....	20
METODOLOGÍA.....	21
DISEÑO	21
FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	21
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	21
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	22
FUENTES DE INFORMACION.....	22
TERMINOS DE BUSQUEDA	22
TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN	23
SELECCIÓN DE ESTUDIOS	23
DIAGRAMA DE MANEJO DE INFORMACION.....	23
PROCESO DE RECOLECCION DE DATOS.....	24
VARIABLES	25
EVALUACIÓN DE CALIDAD.....	27
SESGOS.....	29
PLAN DE ANÁLISIS	29
ASPECTOS ÉTICOS.....	29

RESULTADOS	30
RESULTADOS DE LA BUSQUEDA	30
DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS	31
SUBCLASIFICACIÓN DE ESTUDIO:	32
CROMOSOMOPATÍAS	33
RH FETAL	34
SEXO FETAL	35
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	47
CRONOGRAMA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Árbol (Tomado de las Guías PRISMA)

Figura 2: Diagrama de Variables

Figura 3: Criterios para Evaluación del CEBDM

Figura 4: Diagrama Estudios Incluidos

Figura 5: Tipos de Estudios

Figura 6: Nivel de Evidencia QUADAS-2

Figura 7: Nivel de Evidencia CEBDM

Figura 8: Distribución de Estudios de acuerdo a Patología Fetal.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de Variables

Tabla 2. Variables a Evaluar al Implementar el QUADAS-2

Tabla 3. Resultados Estudios para Cromosomopatías

Tabla 4. Resultados Estudios para Rh fetal

Tabla 5. Resultados Estudios para Sexo fetal

Tabla 6. Resultados Estudios para Enfermedades Monogénicas

RESUMEN

REVISIÓN SISTEMÁTICA: EFICACIA DEL DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO POR CÉLULAS FETALES LIBRES EN SANGRE MATERNA 1990-2014

Pérez Ana María, Forero María Rosario, Valderrama Nicole

ANTECEDENTES: El aislamiento de células fetales libres o ADN fetal en sangre materna abre una ventana de posibilidades diagnósticas no invasivas para patologías monogénicas y cromosómicas, además de permitir la identificación del sexo y del RH fetal. Actualmente existen múltiples estudios que evalúan la eficacia de estos métodos, mostrando resultados costo-efectivos y de menor riesgo que el estándar de oro. Este trabajo describe la evidencia encontrada acerca del diagnóstico prenatal no invasivo luego de realizar una revisión sistemática de la literatura.

OBJETIVOS: El objetivo de este estudio fue reunir la evidencia que cumpla con los criterios de búsqueda, en el tema del diagnóstico fetal no invasivo por células fetales libres en sangre materna para determinar su utilidad diagnóstica.

MÉTODOS: Se realizó una revisión sistemática de la literatura con el fin de determinar si el diagnóstico prenatal no invasivo por células fetales libres en sangre materna es efectivo como método de diagnóstico.

RESULTADOS: Se encontraron 5,893 artículos que cumplían con los criterios de búsqueda; 67 cumplieron los criterios de inclusión: 49.3% (33/67) correspondieron a estudios de corte transversal, 38,8% (26/67) a estudios de cohortes y el 11.9% (8/67) a estudios casos y controles. Se obtuvieron resultados de sensibilidad, especificidad y tipo de prueba.

CONCLUSIÓN: En la presente revisión sistemática, se evidencia como el diagnóstico prenatal no invasivo es una técnica factible, reproducible y sensible para el diagnóstico fetal, evitando el riesgo de un diagnóstico invasivo.

SYSTEMATIC REVIEW: EFFECTIVENESS OF NON INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS THROUGH FREE FETAL BLOOD CELLS IN MATERNAL BLOOD 1990-2014

Pérez Ana María, Forero María Rosario, Valderrama Nicole

BACKGROUND: Isolation of free fetal cells or fetal DNA in maternal blood opens a window of possibilities for the noninvasive diagnosis of monogenic and chromosomal disorders, and in addition it allows the identification of fetal sex and RH. Currently, there are many studies that evaluate the effectiveness of these methods, showing cost-effective and less risky results than the gold standard. This paper describes the evidence found for noninvasive prenatal diagnosis after conducting a systematic review of the literature.

OBJECTIVES: The aim of this study was to collect evidence that meets the search criteria on the matter of noninvasive fetal diagnosis through free fetal cells in maternal blood, to determine its diagnostic utility.

METHODS: A systematic literature review was conducted to determine whether noninvasive prenatal diagnosis of fetal cells in maternal free blood is effective as a diagnostic method.

RESULTS: 5,893 articles that met the search criteria were found; 67 met the inclusion criteria: 49.3% (33/67) were of cross-sectional studies, 38.8% (26/67) for cohort and 11.9% (8/67) case-control studies. Overall sensitivity, specificity and type of test were obtained.

CONCLUSION: In this systematic review, evidence was found that noninvasive prenatal diagnosis is a feasible, reproducible and sensitive technique for fetal diagnosis, avoiding the risk of an invasive diagnosis.

GLOSARIO

- ACTB: Actina Beta
- ACOG: Colegio Americano de Obstetricia
- ADN: Acido Desoxiribonucleico
- AMELX: Amilogenina GF-PCR
- ALT-1: Alanino-aminotransferasa 1
- BVC: Biopsia de Vellosidades Coriales
- cffDNA: Células Fetales Libres en Plasma Materno
- CFTR: Regulador de ConductasaTransmembranal de Fibrosis Quística.
- Cr. Y: Cromosoma Y
- DANSR: Análisis Digital de Regiones Seleccionadas
- DAZ: Gen Localizado en el Cromosoma Yq11.223
- DYS14: Marcador Especifico del Cromosoma Y
- DYZ1: Secuencia de 3564 bp EcoR1 que representa el mayor componente de una región específica del cromosoma Y.
- ECLAMC: Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas
- FORTE: Fracción Fetal Optimizada para la Evaluación de Riesgo de Trisomía (del inglés, Fetal-FractionOptimizedRisk of TrisomyEvaluation)
- FQ-PCR: PCR Cuantitativa Fluororimétrica (del inglés, FlurogenicQuantitativePolymeraseChainReaction)
- GALT: Galactosa-1-Fosfato Uridiltransferasa
- GAPDH: Deshidrogenasa Gliceraldehido 3-fosfato
- ISET: Aislamiento por tamaño de células tumorales epitelialestrofoblásticas (del inglés, IsolationbySize of EpithelialTumour/Trophoblasticcells)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
- MPS: Secuenciación Masiva Paralela
- MPSS: Secuenciación Masiva de Firmas en Paralelo (del inglés, MassivelyParallelSignatureSequencing)
- MSRE-PCR: PCR con enzimas de restricción sensibles a áreas de metilación (del inglés, PCR Methylation-SensitiveRestrictionEnzymeDigestion)
- NIFTY™: Non-Invasive Fetal Trisomy test
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- OMIM: Online Inheritance in Man
- RASSF1A: Proteína Supresora de Tumores Cardio-Específica con un dominio Ras
- RHD: Grupo Sanguíneo Rhesus
- RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa.
- SMA: Atrofia Muscular Espinal Proximal
- SRY: Región determinante del sexo en el Cromosoma Y
- T13: Trisomía 13
- T18: Trisomía 18
- T12: Trisomía 21
- ZFY: Proteína de dedos de zinc, ligada al Y
- ZFX: Proteína de dedos de zinc, ligada al X

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal invasivo para patologías genéticas fetales tiene su origen hace más de 40 años; con el advenimiento de la amniocentesis y los cultivos celulares derivados de estas muestras⁽¹⁾. Desde entonces, este procedimiento se ha extendido por todo el mundo y se ha utilizado para determinar patologías de origen genético a partir de las 14 semanas de gestación⁽²⁾. La biopsia de vellosidades coriales (BVC) data de la década de los 80, aportando una nueva técnica para obtener información sobre la composición genética de un feto en edades gestacionales más tempranas⁽³⁾. Estos dos métodos vienen siendo considerados como el estándar de oro del diagnóstico prenatal ante la sospecha de alteraciones genéticas, ya sea por alteraciones fetales ecográficas, tamizajes genéticos positivos, antecedentes familiares de enfermedades genéticas, edad materna avanzada o ansiedad de los padres frente al diagnóstico. Sin embargo, estas técnicas diagnósticas no son inocuas. La amniocentesis tiene un riesgo del 0.5% de pérdida fetal secundaria al procedimiento y la BVC del 0.5-1% con rangos para las dos que varían del 0.25-2% de acuerdo al entrenamiento del obstetra⁽¹⁾.

La evidencia de células fetales libres en sangre materna data de 1950 cuando se encontraron trofoblastos en los pulmones de madres que habían muerto por preclamsia⁽⁴⁾. Sin embargo, no es sino hasta los años 90 que se da el descubrimiento de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) libres en el plasma materno. Es en 1997, cuando se realiza el primer reporte de aislamiento de ADN fetal en sangre materna con tasas de detección del 80% en 10 microlitros de ADN⁽³⁾. Estos hallazgos abrieron una ventana de posibilidades diagnósticas no invasivas para patologías genéticas monogénicas y cromosomales, así como para la determinación de sexo y RH fetal.

Posterior a este reporte, se introduce el término diagnóstico prenatal no invasivo, el cual es el estudio de las características genéticas de un feto por medio de material obtenido en sangre materna ya sea por células fetales o por ADN fetal libre. Se sabe que las concentraciones de células fetales en sangre materna aumentan con la edad gestacional, con rangos estimados de 2-6 células fetales por ml de sangre materna⁽⁵⁾ o un 3-6% de ADN fetal libre en el plasma materno⁽⁶⁾ y su detección es posible desde la semana 7-9 de gestación⁽⁷⁾. Para este tipo de diagnóstico es esencial una concentración específica de células fetales, así como la diferenciación de las células fetales de las maternas. Actualmente, se cuentan con varias técnicas para la diferenciación celular como son la metilación fetal⁽⁸⁾ o la determinación de la longitud del ADN fetal⁽⁹⁾.

Dados los riesgos de las técnicas invasivas, el diagnóstico no invasivo propone una alternativa viable y llamativa con reportes de alta fiabilidad en poblaciones pequeñas y reportes de casos⁽¹⁰⁾. Se calcula que en promedio, entre un 0-5-7% de las mujeres sometidas al estudio no obtendrán resultados de ADN fetal por muestra insuficiente⁽¹⁾ y existe también la posibilidad de falsos positivos secundarios a la mala extracción o a que el material obtenido de la sangre materna sea insuficiente, como también falsos positivos secundarios a fallas técnicas (contaminación o embarazos gemelares).

A pesar de las limitaciones descritas, hoy en día estas técnicas son altamente específicas y sensibles para las T21 y T18 y hacen parte de las recomendaciones del Colegio Americano de Obstetricia (ACOG), quienes las recomiendan como método diagnóstico para toda mujer gestante, independiente de la edad y especialmente en aquellas mujeres en riesgo para trisomía 13, 21 o 18 (T13, T21 o T18, respectivamente).⁽¹¹⁾

JUSTIFICACIÓN

Dentro de las alteraciones genéticas prenatales, las cromosomopatías son las más frecuentes y entre estas, la de mayor prevalencia es el Síndrome Down o T21. Se ha calculado que a la mayoría de los 4 millones de mujeres que anualmente tienen un parto en EE.UU se les ha realizado una prueba de diagnóstico prenatal para la detección de alguna cromosomopatía.

Actualmente se cuentan con diferentes tipos de métodos diagnósticos como son: el diagnóstico ecográfico (tamizaje ecográfico), el diagnóstico serológico en primer y segundo trimestre (tamizaje sérico), el diagnóstico ecográfico y serológico (tamizaje genético), el diagnóstico invasivo (biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis) y el diagnóstico no invasivo. El diagnóstico por tamizaje ecográfico en primer trimestre para la trisomía 21 tiene una tasa de detección del 82-87%⁽¹²⁻¹⁵⁾, mientras que la tasa de detección para esta condición mediante el tamizaje genético es del 95%. Los diagnósticos invasivos son certeros pero presentan un riesgo de pérdida de embarazo del 1%, además de otras complicaciones relacionadas con el procedimiento.

Gracias a los descubrimientos y avances de la medicina perinatal es ahora posible la realización de un diagnóstico no invasivo por células fetales en sangre materna, el cual ha mostrado en varios estudios una tasa de detección mayor del 99%, con una tasa de falsos positivos menor del 0.1%⁽¹⁶⁻²¹⁾. Sin embargo, este no sustituye el diagnóstico por tamizaje genético en primer trimestre ni los métodos invasivos.

Colombia tiene una población aproximada de 48.32 millones de habitantes, con un crecimiento anual de la población de 1.16% y una expectativa de vida de 74 años⁽²²⁾. En general, la enfermedad genética en Colombia tiene una frecuencia que oscila entre 30 y 52 por cada 1,000 habitantes⁽²³⁾, dato que concuerda con las cifras reportadas en la literatura mundial. Las malformaciones congénitas de origen multifactorial corresponden al 50% del total, seguida por las cromosomopatías y las alteraciones de origen monogénico. En la base de datos de Online Inheritance in Man (OMIM) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) existen a la fecha 4,341 condiciones de origen monogénico (mendeliano) con fenotipo y genotipo conocido, y 1671 con fenotipo conocido y genotipo que se sospecha mendeliano⁽²⁴⁾.

Cromosomopatías

Las alteraciones cromosómicas, que son variaciones en el número o en la estructura de los cromosomas, generalmente se deben a errores durante la gametogénesis o en las primeras divisiones del embrión, y pueden ser heredadas por los padres o pueden ser producto del azar⁽²⁵⁾. Se estima que cerca de un 60% de los abortos ocurridos en el primer trimestre de gestación se deben a anomalías cromosómicas, una de cada 250 a 500 personas es portadora de una alteración estructural y un 0.5% de los recién nacidos presentan aneuploidías⁽²⁶⁾.

Las cromosomopatías pueden dividirse en:

- Aneuploidías de cromosomas autosómicos: son alteraciones en el número de copias de alguno de los cromosomas no sexuales. En humanos, no todas las aneuploidías numéricas son viables, y las que sí lo son producen alteraciones en el fenotipo. Entre las más frecuentes se destacan: la T21 más conocida como Síndrome Down (i.e., 95% de los casos). En Colombia su prevalencia ha sido estimada por el ECLAMC (i.e., Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas) en 1.72 por 1000 nacimientos para el periodo de 1998 a 2005⁽²⁷⁾. En otras fuentes se encuentra que la prevalencia está calculada en 1 en 700 nacidos vivos⁽²⁸⁾. La T18 más conocida como Síndrome Edwards tiene una incidencia de 1 en 8,000, la T13 más conocida como Síndrome Patau tiene una incidencia de 1 en 10,000. A nivel general, la T21 tiene una prevalencia mucho menor que las anteriores en nuestro país.

- Aneuploidías de cromosomas sexuales: son alteraciones en el número de copias de alguno de los dos cromosomas sexuales. Las aneuploidías en este caso suelen ser viables. Entre las más frecuentes se destacan el Síndrome Klinefelter (i.e., trisomía de los cromosomas sexuales: 47, XXY), con una prevalencia en Colombia de 13 por 10,000 nacimientos (incidencia de 1 en 800) y el Síndrome Turner (i.e., monosomía de los cromosomas sexuales: 45, X), que es la única monosomía viable y tiene una prevalencia en Colombia de 5 por 10,000 nacimientos (incidencia de 1 en 2,000). Otros con muy baja prevalencia son el Síndrome doble Y (47, XYY) y el Síndrome triple X (47, XXX).
- Alteraciones cromosómicas estructurales: son las alteraciones que afectan la estructura del cromosoma en cuanto a la ordenación lineal de los genes y que pueden ser deleciones, duplicaciones e inversiones, entre otras⁽²⁹⁾.

Enfermedades autosómicas recesivas

Las enfermedades autosómicas recesivas se presentan cuando un individuo tiene mutaciones en ambas copias de su gen y de esta manera manifiesta la enfermedad. Estos alelos mutados provienen de sus padres, que habitualmente son heterocigotos sanos (i.e., poseen una copia normal del gen y una mutada). Con mayor frecuencia se asocian a consanguinidad, grupos étnicos con alta endogamia o regiones geográficas con poca migración poblacional⁽³⁰⁾. Algunas de las más prevalentes en Colombia son las siguientes:

- Fibrosis quística (FQ): es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica. Se presenta con compromiso multisistémico, crónico y progresivo. Su principal sintomatología es pulmonar, con infecciones a repetición pero también puede tener afectación pancreática y gastrointestinal. (Cystic Fibrosis MutationDatabase.⁽³¹⁾). La incidencia oscila entre 1:1,900 a 1:3,700 recién nacidos vivos, con una frecuencia de portadores del 5% en población caucásica. En asiáticos y afroamericanos la incidencia es de 1:32,000 y 1:15,000 recién nacidos vivos respectivamente. En Colombia se estima que la tasa de portadores es de 1 de cada 47 personas⁽³²⁾. El gen *CFTR* está ubicado en el cromosoma 7 y se han descrito más de 1,700 mutaciones causantes de la enfermedad, con frecuencias individuales variables de acuerdo con la población estudiada (Cystic Fibrosis MutationDatabase⁽³¹⁾). La mutación más común es la deleción de la base fenilalanina en la posición 508 de la proteína y se observa en el 85% de los caucásicos y en el 28-42% de la población colombiana (Cystic Fibrosis MutationDatabase⁽³¹⁾)⁽³²⁾. Existen adicionalmente 25 mutaciones frecuentes en caucásicos y son las que se recomienda que sean estudiadas en familias en riesgo⁽³³⁾. En Colombia las más frecuentes son: 1811 + 1,6 kbA> G, 621 + 1G > T y G542 X que representan el 9% de la población⁽³⁵⁾.
- Atrofia Muscular Espinal: son un grupo de diferentes enfermedades heredadas que se caracterizan por la degeneración de las neuronas motoras de las astas anteriores de la médula espinal con atrofia muscular, hipotonía, arreflexia y parálisis progresiva⁽³⁶⁾. Después de la fibrosis quística, es el trastorno autosómico recesivo más común con una tasa de portadores de 1 en 35-60 personas según diferentes estudios. Afecta a uno de cada 6,000 a 10,000 niños, y es la causa genética más frecuente de mortalidad infantil⁽³⁷⁾. Se estima una prevalencia de 1/80,000 y una incidencia anual de 1/10,000, aproximadamente.
- Hemoglobinopatías: son defectos en la estructura de una de las cadenas de globina de la molécula de hemoglobina. La condición más frecuente es la anemia de células falciformes, y se estima que el 7% de la población africana es portadora. También es frecuente en el sureste asiático y el mediterráneo. Se caracteriza por la presencia de hemoglobina S (HbS)⁽³⁸⁾. La hemoglobina humana normal es un tetrámero compuesto de dos cadenas de hemoglobina α y dos β . La HbS es el resultado de una mutación puntual en el gen *HBB* (Glu6Val). Esta anemia puede resultar de la combinación de HbS con otras variantes de

cadena β -globina anormal o con talasemias ⁽³⁹⁾. Las talasemias son defectos que se caracterizan por una reducción en la cantidad de cadenas de globina. La incidencia en Colombia de las hemoglobinopatías es de 4.5% ⁽⁴⁰⁾

PROBLEMA

Las alteraciones genéticas se pueden clasificar de acuerdo a su origen como cromosómicas, monogénicas o mendelianas, multifactoriales y mitocondriales. El diagnóstico de enfermedades cromosómicas se inició hacia 1970 con la introducción de la amniocentesis y en 1980 con la introducción de la BVC ⁽⁴¹⁾. Actualmente la mayoría de las mujeres gestantes se encuentran entre sus 20-39 años con prolongación de la edad materna del primer embarazo. Sin embargo, se ha evidenciado una prevalencia importante de malformaciones genéticas en embarazos de mujeres jóvenes para las cuales la BVC o amniocentesis no son métodos rutinarios viables, debido a los riesgos que impone el procedimiento (i.e., riesgo de pérdida del 1%). Por esta razón se han creado sistemas de diagnóstico no invasivo como son el tamizaje genético complementado por pruebas serológicas, los cuales, en caso de ser positivos, requieren de la toma de una BVC o amniocentesis para su confirmación diagnóstica.

La posibilidad de aislar células fetales y ADN fetal de la sangre materna ha abierto una inmensa oportunidad para mejorar el diagnóstico fetal no invasivo y así eliminar los riesgos derivados de la amniocentesis/BVC. Existen numerosos reportes sobre diagnóstico de células fetales en sangre materna para aneuploidías (i.e., T21, T18, T13, entre otras), Rh fetal, sexo fetal y otras alteraciones genéticas para las cuales se utilizan diferentes técnicas. En Colombia, es en los años ochenta cuando llega la ecografía obstétrica, y su uso se hace rutinario en los años noventa. Además, los laboratorios de citogenética estandarizaron el cariotipo con la tinción con giemsa –conocido como bandas G–, e implementaron su uso en líquido amniótico y vellosidades coriales también en los años noventa. Nuevamente en los años noventa, las pruebas moleculares como FISH, QF-PCR y MLPA, fueron desarrolladas en el análisis cromosómico, pero el cariotipo continuó siendo el estándar de oro en el diagnóstico prenatal ⁽⁴²⁻⁴³⁾. En la literatura médica, no se cuenta con información disponible en una revisión sistemática que recolecte el estado del arte de la literatura sobre las diferentes técnicas de diagnóstico y la eficacia para detectar los diferentes tipos de enfermedad. Adicionalmente se cuenta con resultados contradictorios en cuanto a los valores predictivos positivos y negativos. Según estos datos se planteó la pregunta de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

PREGUNTA PRINCIPAL:

¿El uso células fetales libres en sangre materna es un método de diagnóstico prenatal útil en gestantes de alto y bajo riesgo?

PREGUNTAS SECUNDARIAS:

- ¿Cuál es la información científica disponible acerca del uso de células fetales libres en sangre materna como método de diagnóstico prenatal?
- ¿Cuáles son las características de los estudios encontrados?
- ¿Cuáles son los tipos de técnicas realizadas para el diagnóstico prenatal no invasivo con células fetales libres en sangre materna?
- ¿Cuál es la correlación entre la clínica y las intervenciones diagnosticas realizadas?

MARCO TEÓRICO

El diagnóstico genético prenatal tradicionalmente ha requerido de técnicas invasivas como la amniocentesis y la BVC. Sin embargo, cada uno de estos procedimientos conlleva un riesgo de pérdida fetal. El Tamizaje analítico de la sangre materna y el ultrasonido pueden identificar individuos en riesgo de tener aneuploidías fetales (especialmente la T21), pero como otros métodos de tamizaje no invasivo, estos tienen sensibilidades sub-óptimas y altas tasas de falsos positivos. Por años muchos autores se han enfocado en el aislamiento de células fetales intactas a partir de la sangre materna.

Durante el embarazo, las circulaciones materna y fetal se encuentran separadas por las membranas placentarias. Sin embargo, existe evidencia que demuestra que esta barrera es incompetente al tráfico celular. Es importante mencionar que células fetales nucleadas han sido identificadas en la circulación materna y han sido ampliamente estudiadas como sustratos para el diagnóstico prenatal no invasivo. Sin embargo, lo escaso de estas células en la sangre materna ha sido el mayor obstáculo a la aplicación rutinaria de este concepto.

El diagnóstico prenatal no invasivo, ha sido un importante objetivo del estudio genético en humanos. A pesar de que existe evidencia de que las células fetales en sangre materna fueron descritas en el siglo XIX por el patólogo Alemán Schmorl, quien descubrió trofoblastos en los pulmones de mujeres embarazadas que murieron de preclamsia, la mayoría de las investigaciones se han realizado a partir del siglo XX. El paso de células fetales nucleadas a la sangre materna es un fenómeno ampliamente reconocido hoy en día. J Walknowska et al ⁽⁴⁴⁾, en 1969, mediante un cultivo de linfocitos tomados de sangre de 30 mujeres embarazadas, encontraron 21 cultivos con una o más figuras en metafase con cinco pequeños cromosomas acrocéntricos interpretados con 46"XY".

Se incluyeron en este estudio 21 mujeres, 19 de ellas tuvieron hijos de sexo masculino. Las células con cariotipo 46/XY fueron encontradas en la circulación materna tempranamente, detectables desde la semana 14. La información disponible sugiere que la transferencia de linfocitos es común en el embarazo y que puede ser una consecuencia de migración transplacentaria de las células linfocíticas fetales. Fue solo hasta los años 80 que se inició el desarrollo de técnicas tales como la identificación de células fluorescentes activadas (i.e., del inglés, FACS) en los Estados Unidos y la identificación magnética de células (i.e., del inglés, MACS) en Alemania, lo que permitió la identificación de estas células. Posteriormente, para lograr el análisis de pocas células en búsqueda de desórdenes mendelianos se desarrolló la técnica de hibridación fluorescente in situ (i.e., del inglés, FISH), lo que facilitó el análisis de cromosomas en células en fase de reposo y el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (i.e., del inglés, PCR, por sus iniciales en inglés), que facilitó el estudio de los rasgos genéticos en una única célula.

En 1989, YMD Lo et al., publicaron el uso de la PCR en células fetales tomadas de sangre materna para la determinación del sexo del feto, y concluyeron que este podría ser un método útil en el diagnóstico prenatal de anomalías genéticas ligadas al sexo ⁽⁴⁵⁾. DW Bianchi et al ⁽⁴⁶⁾, en 1990 estudiaron eritrocitos tomados de sangre materna, identificados con anticuerpos monoclonales contra el receptor de transferrina. Las células tomadas de la sangre de 19 mujeres embarazadas entre la semana 12 y la semana 17 fueron estudiadas mediante la amplificación de ADN obteniendo un 75 % de éxito en el aislamiento del cromosoma Y en madres de fetos de sexo masculino. En 1993, JL Simpson y S Elias ⁽⁴⁷⁾, publicaron en JAMA una revisión del desarrollo de la identificación, aislamiento y análisis de células fetales circulando en sangre materna y exploraron la posibilidad de usar este método en el diagnóstico citogenético prenatal.

Fue en 1996 cuando se empezó a estudiar con mayor interés este tema y cuando se empezó el desarrollo de las técnicas para el aislamiento, identificación y análisis de las células fetales en sangre materna. YMD Lo et al., estudiaron el tráfico de células nucleadas entre el feto y la madre usando sistemas de reacción de polimerasa en cadena suficientemente sensibles para identificar una célula objeto en 100.000 células. Estudiaron sesenta y seis parejas madre e hijo y tomaron muestras de sangre materna y de cordón umbilical para la extracción de DNA. Se detectaron células fetales en 26 de 51 casos y se encontraron células maternas en sangre de cordón en 16 de 38 muestras⁽⁴⁸⁾. MC Cheung et al⁽⁴⁹⁾., en este mismo año reportaron la detección de mutaciones de punto en desórdenes de gen único usando el estudio de células fetales en sangre materna aisladas mediante micro-disección, identificando los genotipos fetales de dos embarazos con riesgo de anemia de células falciformes y B-talasemia.

Existen solamente seis células fetales por mililitro de sangre materna normal⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾, por lo que más recientemente algunos autores se han enfocado en la identificación de DNA fetal libre en el plasma materno. Los ácidos nucleicos fueron inicialmente identificados en el plasma hace más de cincuenta años en pacientes con cáncer. Estos ácidos nucleicos presentaban mutaciones y alteraciones microsatelitales⁽⁵²⁾.

Recientemente, ha crecido el interés en el uso de la parte acelular de la sangre, principalmente plasma, para su análisis molecular. Este interés ha sido impulsado principalmente por el hallazgo de DNA derivado de tumores en el plasma y el suero de pacientes con cáncer⁽⁵³⁻⁵⁴⁾. Estos hallazgos han llevado a pensar que al igual que las células cancerosas pueden ser encontradas en la sangre periférica, de la misma manera las células fetales pueden ser encontradas en la circulación materna.

Todas estas observaciones sugieren que el DNA en sangre materna puede ser útil en el diagnóstico prenatal no invasivo, sin embargo estas técnicas han demostrado ser dispendiosas y costosas para ser implementadas a gran escala. En 1996, CA Heid et al,⁽⁵⁵⁾ desarrollaron un método cuantitativo novedoso de PCR en tiempo real, que provee una cuantificación reproducible y precisa de las copias de genes.

En 1997, Lo YMD et al⁽⁵⁶⁾, utilizaron la ebullición como método para la extracción de ADN de suero o plasma y el uso del método PCR "Hot-Start" para la detección del mismo, con sensibilidades para la detección de ADN fetal en sangre materna del 80% y 70% respectivamente. Con el uso de los métodos comerciales de extracción de ADN con base en columna y con el método sensible de PCR en tiempo real, esta sensibilidad ha alcanzado el 100% para la detección de secuencias cromosomales Y, derivadas del feto y obtenidas del plasma o suero⁽⁵⁷⁾. Mediante el uso de un protocolo sensible basado en PCR, Smid et al⁽⁵⁸⁾, también han obtenido el mismo resultado en madres que tienen fetos masculinos.

Además de mejorar la sensibilidad para la detección, el sistema de PCR en tiempo real descrito por Lo et al⁽⁵⁶⁾, puede también ser usado para medir la concentración de ADN fetal en el plasma y el suero materno. Así las cosas estos autores reportaron concentraciones fraccionales promedio de ADN fetal de 3.4% y de 6.2% en el plasma materno en el primer y segundo y en el tercer trimestre, respectivamente. También encontraron mediante el seguimiento de la concentración de ADN fetal en la sangre de mujeres embarazadas que esta concentración aumenta con la edad gestacional, siendo más significativa al final del embarazo.

La detección de secuencias de cromosomas y derivados del feto tiene una aplicación potencial en el diagnóstico de desórdenes ligados al sexo⁽⁵⁹⁾. Además del cromosoma Y, el primer locus genético al que los investigadores han enfocado su interés es el gen *RHD*, cuya presencia produce el fenotipo Rhesus D positivo⁽⁶⁰⁾. Este hallazgo ha sido muy importante en la detección de fetos RH

positivos hijos de madres RH negativos, método que se ha encontrado muy confiable especialmente en el último trimestre del embarazo⁽⁶¹⁻⁶²⁾.

Otros grupos se han concentrado en la detección de polimorfismos microsatelitales heredados del padre identificados a partir de la sangre materna, en especial los de los cromosomas 13, 18 y 21⁽⁶³⁾. Otros autores se han enfocado en la detección de polimorfismos microsatelitales del cromosoma X heredados del padre, identificados del plasma materno de madres de fetos femeninos, y en otros se han concentrado en las expansiones causantes de enfermedad heredadas del padre del gen de la proteína-quinasa de la distrofia miotónica (i.e., del inglés, *DMPK*)⁽⁶⁵⁾. La translocación cromosómica de la parte distal del cromosoma 3p heredado del padre también ha sido estudiada⁽⁶³⁾.

Una de las más importantes indicaciones del diagnóstico prenatal es la detección de la T21. Lo et al⁽⁶⁴⁾., ha descrito un aumento del ADN fetal en sangre materna en embarazos afectados por T21, lo que abre la posibilidad de usar el ADN fetal en plasma materno para hacer tamizaje de las aneuploidías cromosomales, en especial en unión con otros marcadores bioquímicos de suero ya establecidos. Wijk et al⁽⁶⁵⁾, demostraron que parte del ADN fetal presente en la circulación materna existe en la forma de células, lo que sugiere que se puede realizar análisis tipo FISH in situ en dichas células fetales aisladas del plasma materno para un diagnóstico definitivo de aneuploidías cromosómicas..

Otro desorden asociado con el embarazo es la preclamsia, que continua siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad materno fetal. Lo et al⁽⁶⁶⁾, demostraron un incremento de cinco veces en la concentración de ADN fetal en el suero obtenido de mujeres afectadas por preclamsia comparadas con controles. Esta relación aún tiene que ser dilucidada aunque ya se ha demostrado que este aumento de ADN fetal puede ser identificado semanas antes del inicio de la preclamsia⁽⁶⁷⁾

PROPÓSITOS

El diagnóstico fetal no invasivo actualmente se utiliza como alternativa para diagnóstico de alteraciones fetales de origen monogénico, cromosómico, determinación de sexo fetal y de grupo sanguíneo. Se ha demostrado por un estudio de costos que el diagnóstico prenatal no invasivo es una estrategia económicamente más eficiente para el diagnóstico prenatal en mujeres con embarazo de alto riesgo⁴³ dado que tiene una mejor tasa de detección y disminuye el requerimiento de procedimientos invasivos no necesarios.

Por tales motivos, el propósito de esta revisión es evaluar si el diagnóstico prenatal no invasivo por células fetales libres en sangre materna es un método seguro, eficaz y con posibilidad de ser implementado en la práctica clínica, para realizar undiagnóstico prenatal temprano que permita ofrecer posibilidades de manejo y consejería a las mujeres embarazadas a quienes se les compruebe tempranamente que sus hijos padecen de alguna patología, ya sea que la misma pueda ser tratada o prevenida con manejo médico o quirúrgico, o que le permita tomar decisiones acerca de su embarazo. Con el avance rápido de la ciencia, pronto estas técnicas podrán identificar otras patologías y las posibilidades para las mujeres que quieren tener un hijo se hacen más y más seguras para lamadre y para los hijos.

OBJETIVOS

GENERAL

Reunir de forma exhaustiva y sistemática toda la evidencia, publicada o no, que cumpla los criterios de búsqueda y elegibilidad sobre el diagnóstico fetal no invasivo de células fetales libres en sangre materna para determinar la utilidad diagnóstica (i.e., definida como correlación del diagnóstico prenatal con el diagnóstico post-natal) del mismo.

ESPECÍFICOS

- Identificar la información contenida en la literatura sobre la población obstétrica de alto y bajo riesgo en cuanto a diagnóstico fetal no invasivo por células en sangre materna.
- Evaluar la calidad metodológica de cada uno de los estudios para obtener resultados y conclusiones globales de la técnica.
- Definir de acuerdo con los estudios, la eficiencia (i.e., correlación del diagnóstico prenatal con el diagnóstico post-natal) de la prueba para: sexo fetal, Rh fetal y alteraciones genéticas.
- Determinar la reproducibilidad de las técnicas usadas en el diagnóstico prenatal no invasivo de acuerdo a lo publicado en la literatura.
- Reportar los hallazgos descritos por medio de una revisión sistemática de la literatura.
- Identificar necesidades de investigación ulterior respecto a esta metodología de diagnóstico prenatal.

METODOLOGÍA

DISEÑO

Tipo de estudio: Revisión sistemática, de acuerdo a las Guías PRISMA 2009 ⁽⁷⁰⁾ para revisiones sistemáticas y meta-análisis. Se realizó una búsqueda exhaustiva de todos los estudios publicados en las bases de datos electrónicas: Medline (EbscoHost) (hasta Agosto /2014), Biblioteca virtual de la salud (BVS) (hasta Agosto/2014), PubMed (hasta Agosto/2014), base de datos de la universidad del Rosario (EbscoHost) (hasta Agosto/2014), Scopus (hasta Agosto/2014), Cochrane Data Base (hasta Agosto/2014), búsqueda manual de artículos relevantes, en las listas de referencias de los documentos resultantes de la búsqueda sin restricción de fecha o idioma.

FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Hipótesis Nula

El diagnóstico prenatal no invasivo con células fetales libres en sangre materna no tiene una adecuada correlación prenatal y post natal.

Hipótesis Alterna

El diagnóstico prenatal no invasivo con células fetales libres en sangre materna tiene una adecuada correlación prenatal y post natal.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

TIPOS DE ESTUDIOS:

Ensayos clínicos aleatorizados y no aleatorizados, estudios de cohortes, estudios corte transversal y estudios de casos y controles que evalúan la eficacia del método diagnóstico evaluado.

TIPOS DE PARTICIPANTES:

Estudios que incluyan pacientes en embarazo a quienes se les practique una prueba de diagnóstico fetal no invasivo en sangre materna antes de la semana 37 de gestación.

TIPOS DE TÉCNICAS:

Estudios en los cuales se realice diagnóstico prenatal no invasivo fetal en sangre materna y se cotejen los resultados con pruebas de amniocentesis o BVC durante el embarazo o en el periodo postnatal.

MEDIDAS DE RESULTADO:

Desenlace Primario: Diagnóstico fetal acertado por medio de células fetales libres en sangre materna.

Desenlace Secundario: Determinación de las diferencias en la utilidad de los distintos métodos utilizados.

OTRAS CONSIDERACIONES:

No se realizó restricción de idioma o fecha en la búsqueda.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Estudios que cumplieran con los criterios de inclusión, pero cuya información no permite concluir si la técnica es útil.
- Todo estudio que incluyó menos de 5 participantes.
- Estudios duplicados.
- Estudios que mostraron resultados en células o animales.
- Estudios para los cuales se tomó una muestra de células fetales en sangre materna, pero esta se utilizó para determinar patologías propias del embarazo o la madre y no para patologías fetales (i.e., diagnóstico de pre-eclampsia).
- Estudios con un puntaje en el CEDBM inferior a nivel 3 o que de los 10 criterios evaluados en según el QUADAS respondían NO en más de 8 ítems.
- Estudios del tipo revisiones sistemáticas y meta-análisis (i.e., sin embargo, se tuvieron en cuenta para revisar la bibliografía y para realizar la búsqueda activa).

FUENTES DE INFORMACION

Los estudios se identificaron por medio de bases de datos electrónicas. La búsqueda se realizó en Medline (EbscoHost) (hasta Agosto /2014), Biblioteca virtual de la salud (BVS) (hasta Agosto/2014), PubMed (hasta Agosto/2014), base de datos de la universidad del Rosario (EbscoHost) (hasta Agosto/2014), Scopus (hasta Agosto/2014), Cochrane Data Base (hasta Agosto/2014), búsqueda manual de artículos relevantes, en las listas de referencias de los documentos resultantes de la búsqueda.

En caso de no obtener la información suficiente de los estudios, se intentó contactar por correo electrónico a los autores para la verificación o ampliación de datos. Una vez obtenida la búsqueda se hizo una selección por medio de EndNote para el análisis de duplicados y una segunda selección manual para evaluar duplicaciones omitidas previamente y verificar referencias.

TERMINOS DE BUSQUEDA

MeSH:

- "Maternal SerumScreeningTests"
- "Prenatal Diagnosis"
- "GeneticTesting"
- "DNA"
- "Cell-free system"
- "Fetus"

DeCS:

- Diagnóstico prenatal (Diagnóstico Pre-Natal)
- DNA (ADN)
- Sistema libre de células (Sistema livre de células)
- Feto
- Diagnóstico prenatal
- Pruebas de Tamizaje en Suero Materno
- Prueba genética

Key words/Palabras claves:

- DNA Fetal Libre Y Diagnóstico Prenatal No Invasivo.
- DNALivre Fetal E Diagnóstico Pre-Natal Não Invasivo.
- Cell Free Fetal DNA And Prenatal Non Invasive Diagnosis.

TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN

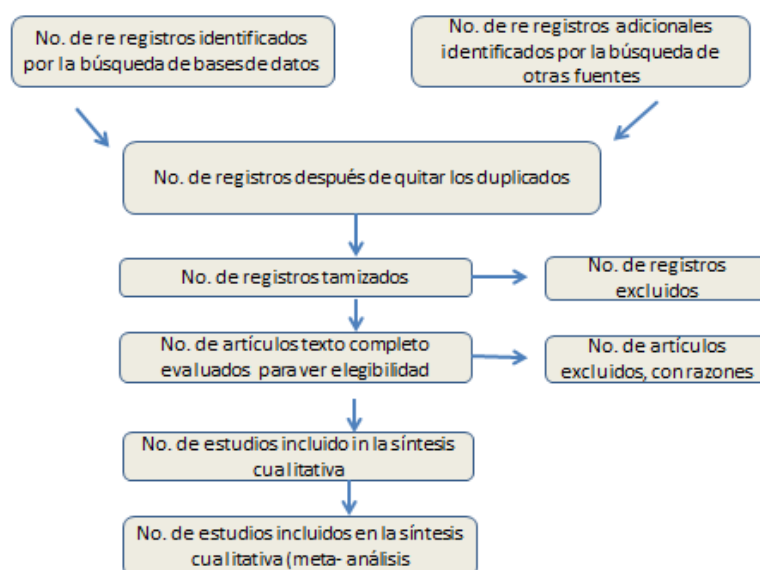
SELECCIÓN DE ESTUDIOS

Se seleccionaron todos los estudios relevantes basados en una preselección por medio del título del estudio y el resumen (abstract) del mismo. En caso de dudas, se amplió la revisión al artículo completo. Para los estudios excluidos, estos fueron revisados por las tres investigadoras previo a la exclusión para llegar a consenso y disminuir sesgos. Aquellos estudios en otro idioma fueron traducidos para determinar su relevancia e inclusión. Una vez preseleccionados los estudios se revisaron de forma detallada verificando el cumplimiento de los criterios establecidos en la revisión. En caso de desacuerdos estos fueron resueltos por consenso.

DIAGRAMA DE MANEJO DE INFORMACION

Se presentaron los estudios de acuerdo al diagrama establecido en las guías PRISMA ⁽⁶⁸⁾ (Fig. 1)

Figura 1. Diagrama de Árbol



PROCESO DE RECOLECCION DE DATOS

Se realizó una extracción de la información por medio de una hoja de recolección de datos. El autor revisor extrajo los datos de los estudios incluidos y un segundo autor realizó una revisión de los datos extraídos de forma independiente y sin comentarlos con el primer autor (i.e., para así disminuir sesgos). Las diferencias de extracción fueron resueltas por discusión entre los revisores y en caso de no ser posible la resolución, el tercer autor decidió.

Los siguientes datos fueron extraídos de los estudios:

- Referencia Completa
- Número de identificación de acuerdo a la búsqueda inicial
- Autor (Apellido. Inicial primer nombre)
- Año de publicación del estudio
- Tipo de Estudio
- Nivel de evidencia CEDBM
- Nivel de evidencia QUADAS2
- Si es o no multicéntrico
- País del estudio
- Población del estudio (alto o bajo riesgo obstétrico)
- Año en el que se realizó el estudio
- Edad gestacional de inclusión
- Toma de tamizaje genético prenatal
- Toma de diagnóstico invasivo
- Tipo de diagnóstico invasivo
- Técnica para extracción de ADN fetal
- Técnica para el análisis del ADN fetal
- Información adicional sobre la técnica
- Número total de muestras
- Muestras no Incluidas
- Porqué la no inclusión de la muestras
- Tipo de diagnóstico
- Sexo Fetal
- RH fetal
- Alteraciones cromosómicas
- Alteraciones monogénicas
- Sensibilidad del estudio
- Especificidad del estudio
- Total de muestras incluidas
- Correlación post natal
- Valor predictivo negativo del estudio
- Valor predictivo positivo del estudio

VARIABLES

Se clasificaron de acuerdo a sus características operacionales (tabla 1) y se determinó las variables dependientes, independientes y de confusión, así como la posible interacción entre ellas. (Figura 2)

VARIABLES DEPENDIENTES

- Correlación prenatal y postnatal.

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Datos característicos del estudio
- Población de alto o bajo riesgo
- Toma de tamizaje genético
- Toma de pruebas invasivas
- Tipo de diagnóstico invasivo
- Edad gestacional de la toma

VARIABLES DE CONFUSIÓN

- Diferentes tipos de técnicas de extracción y de tipificación del ADN fetal.
- Número total de muestras

Figura 2: Diagrama de variables

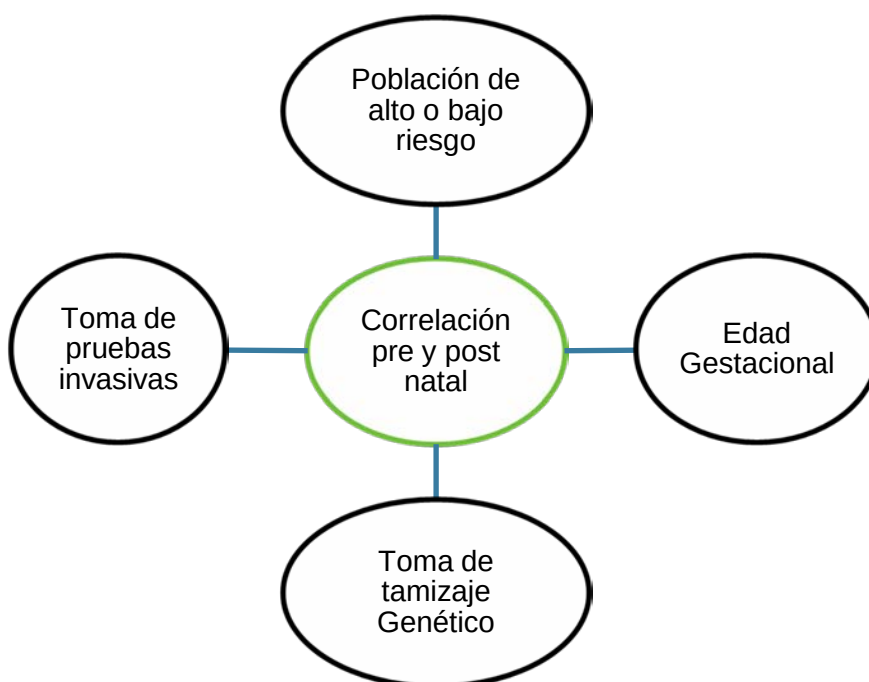


Tabla 1: Operacionalización de Variables

VARIABLE	TIPO VARIABLE	CATEGORIZACIÓN	DEFINICIÓN
Referencia	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Número de referencia del artículo
Autor	Cualitativa (Nominal)	Apellido Inicial y letra inicial de nombre.	Nombre del autor principal
Año	Cuantitativa (Numérica Continua)	Año	Año de publicación
Tipo de Estudio	Cualitativa (Nominal)	1. Casos y controles 2. Reporte de casos 3. Meta-análisis 4. Cohorte 5. Ensayo clínico 6. Corte transversal	Tipo de estudio realizado
Nivel de Evidencia	Cualitativa (Ordinal)	1. Nivel 1 2. Nivel 2 3. Nivel 3 4. Nivel 4 5. Nivel 5	Nivel de evidencia de acuerdo al CEDBM 2011
Nivel de Evidencia	Cuantitativa (Nominal)	1. Si 2. No	Nivel de evidencia de acuerdo al QUADAS2
Localización del Estudio	Cualitativa (Nominal)	País	País donde se realizó el estudio
Población de Estudio	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Número total de participantes en el estudio
Años del Estudio	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Años totales que duró el estudio
Población de Riesgo	Cualitativa (Nominal)	1. Bajo riesgo 2. Alto riesgo 3. 999 No hay datos 4. No Aplica	Definición de paciente como alto y bajo riesgo de acuerdo a criterios de la ACOG
% Población de Riesgo	Cuantitativa (Numérica Continua)	Proporción de la Muestra	Porcentaje de pacientes en riesgo
Edad Gestacional	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Edad gestacional en semanas desde la última regla
Técnica Implementada	Cualitativa (Nominal)	Nombre de la Técnica implementada	Tipo de análisis genético realizado
Tipo de Diagnóstico	Cualitativa (Nominal)	1. Cromosómicas 2. Sexo 3. Rh 4. Monogénicas 5. Mitocondriales	Diagnóstico para el cual fue determinado el estudio
Técnica de Recolección de muestra	Cualitativa (Nominal)	Si la técnica de recolección es estandarizada o no.	Medidas utilizadas para la toma de la muestra
Número total de muestras	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Total de muestras obtenidas
% del total de muestras	Cuantitativa (Numérica Continua)	Porcentaje de la Muestra	Porcentaje de total de muestras obtenidas
Total de muestras adecuadas	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Total de muestras viables para la extracción
% Total de muestras adecuadas	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Porcentaje total de muestras viables
Muestra insuficiente	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Total de muestras que no fueron viables
% muestra insuficiente	Cuantitativa (Numérica Continua)	Porcentaje de la Muestra	Porcentaje muestras no viables
Sensibilidad	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Capacidad de detectar verdaderos positivos
Especificidad	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Capacidad de detectar verdaderos negativos
Valor Predictivo Positivo	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Probabilidad de tener la enfermedad si la prueba es positiva
Valor Predictivo Negativo	Cuantitativa (Numérica Continua)	Número	Probabilidad de no tener la enfermedad si la prueba es negativa

EVALUACIÓN DE CALIDAD

Una vez seleccionados los estudios, se recuperaron en texto completo. Dos investigadores realizaron de manera independiente la lectura de cada artículo para la evaluación de calidad. La calidad y fuerza de la evidencia científica soportada en la adecuada eficiencia para realizar el diagnóstico prenatal mediante una técnica no invasiva con células fetales libres, se evaluó por medio de los criterios de Oxford⁽⁶⁹⁾ (figura 3) así como por la escala del QUADAS-2⁽⁷⁰⁾ (Tabla 2). Se decidió no incluir dentro de la revisión dos criterios del QUADAS-2⁽⁷⁰⁾. Estos criterios fueron por un lado si el estándar de referencia (i.e., del inglés, gold standard) diagnóstica adecuadamente a las pacientes, dado que para esto ya se cuentan con estudios que demuestran su validez; y por otro lado si el estándar de referencia es independiente del examen en cuestión puesto que se tratan de dos técnicas diferentes y no es necesaria su categorización.

Se categorizó la respuesta al QUADAS-2⁽⁷⁰⁾: Si, bajo riesgo de sesgo y no, como potencial riesgo de sesgo.

Tabla 2: Variables a evaluar al implementar el QUADAS-2⁽⁷⁰⁾

Criterios QUADAS-2	
1.	Fue el espectro de los pacientes representativo de los pacientes que recibirán esta prueba en la práctica médica?
2.	Fueron los criterios de selección claramente descritos?
3.	Es el tiempo entre el estándar de referencia y la prueba a evaluación suficiente para asegurar que se puede analizar la condición sin que esta sufra cambios?
4.	Recibió verificación con el GOLD estándar toda la muestra o una selección aleatoria de la misma?
5.	Recibieron los pacientes el test estándar sin importar los resultados del estudio en investigación?
6.	Fue descrito el test de prueba lo suficiente para poder determinar su replicabilidad?
7.	Se interpretaron los resultados de las pruebas diagnósticas sin conocer los resultados del estándar de referencia diagnóstico?
8.	Se posee la misma cantidad de datos clínicos disponibles cuando se interpretan los resultados del test y en la práctica clínica?
9.	Reportaron los resultados no analizados o intermedios?
10.	Se determinó por qué la no inclusión de pacientes?

Figura 3: Criterios para evaluación del CEBDM⁽⁶⁹⁾

PREGUNTA	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3	NIVEL 4	NIVEL 5
Que tan común es el problema?	Encuesta, muestra aleatoria local y actual (oo censo)	Revisión sistemática de encuestas que permiten pertinencia a situaciones locales**	Muestra local no aleatorizada**	Serie de casos **	N/A
Es este diagnóstico o examen de monitoreo adecuado? (Diagnóstico)	Revisión sistemática o estudios cross-sectional que comparan consistentemente con la referencia estándar y enmascaramiento.	Estudios individuales cross-sectional que comparan consistentemente con la referencia estándar y enmascaramiento	Estudios no consecutivos, o estudios sin estándar de referencia aplicado consistentemente.	Estudios de casos-control o aquellos que tengan pobre o no tengan referencia con el estándar**	Razonamiento o como mecanismo de base.
Qué pasará si no se agrega la terapia? (pronóstico)	Revisión sistemática o estudios de cohorte de inicio.	Estudios de cohorte de inicio	Estudios cohorte o un brazo control de un estudio aleatorizado.	Serie de casos, casos-control, o con pobre calidad en estudios de pronóstico tipo cohorte **	N/A
Esta intervención ayuda? (beneficios de tratamiento)	Revisión sistemática con ensayos aleatorizados o ensayos n-de-1	Estudios aleatorizados u observacionales con un efecto del estudio dramático	Estudios no aleatorizados controlados tipo cohorte o de seguimiento **	Serie de casos, casos-control o estudios controlados históricos**	Razonamiento o como mecanismo de base.
Cuáles son los eventos adversos comunes? (eventos adversos del tratamiento)	Revisión sistemática de estudios aleatorizados, revisión de casos y controles anidados, ensayos n-de-1 con el paciente a quien se le está haciendo la pregunta o estudios observacionales con un efecto dramático.	Estudios individuales aleatorizados o (excepcionalmente) observacionales con un efecto dramático.	Estudios no aleatorizados controlados tipo cohorte o de seguimiento (vigilancia post-mercado) que proveen suficiente muestra para descartar eventos adversos comunes. (Para aquellos eventos adversos de larga evolución, el seguimiento debe ser adecuado)	Serie de casos, casos-control o estudios controlados históricos**	Razonamiento o como mecanismo de base.
Cuáles son los eventos adversos raros? (eventos adversos del tratamiento)	Revisión sistemática de ensayos aleatorizados o n-de-1.	Estudios aleatorizados o (excepcionalmente) observacionales con un efecto dramático.			
Es este examen (la detección temprana) necesaria? (tamizaje)	Revisión sistemática de ensayos aleatorizados.	Estudios aleatorizados	Estudios no aleatorizados tipo cohorte/ estudios de seguimiento **	Serie de casos, casos-control o estudios controlados históricos**	Razonamiento o como mecanismo de base.

**El nivel puede ser calificado en las bases de la calidad del estudio, falta de precisión, no respuesta a la pregunta PICO, inconsistencias entre los estudios, tamaño del efecto pequeño. El nivel debe ser mejor calificado si hay un tamaño de efecto grande.

Tabla modificada y traducida del CEMD ⁽⁶⁹⁾

SESGOS

- Riesgo de sesgo en los estudios individuales:
Se realizó un ejercicio preliminar entre los revisores y su tutor para determinar la aplicabilidad y factibilidad de las tablas usadas en el estudio. Para determinar la validez de los estudios, los revisores trabajaron de manera independiente y determinaron los puntajes de las tablas de esta forma.
- Sesgo de Publicación:
Para la eliminación de este sesgo se realizó la búsqueda en bases de datos de literatura gris y también se incluyeron aquellos estudios no publicados en las bases de datos electrónicas.
- Sesgo de Lenguaje:
No se realizaron exclusiones de los artículos por idioma, aquellos en otro idioma fueron traducidos.

PLAN DE ANÁLISIS

Dada la heterogeneidad de los estudios evaluados, se consideró que no cumple con los criterios necesarios para meta-analizar. Se realizó un análisis descriptivo y se interpretaron los resultados de acuerdo a este.

ASPECTOS ÉTICOS

Dado que la presente investigación se encuentra catalogada dentro del Artículo 11 de la Resolución, N. 008430 del 4 de Octubre de 1993⁽⁷¹⁾ como “investigación sin riesgo”, se considera que no es necesario presentar este estudio ante el comité de ética médica así como tampoco la firma de consentimiento informado. Por qué se revisan estudios clínicos ya publicados y no información particular de pacientes. No se pondrá en riesgo a ninguno de ellos. De igual manera se preservarán con exactitud los datos de los resultados obtenidos, siguiendo los principios reconocidos científicamente y cumpliendo con la declaración de Helsinki.

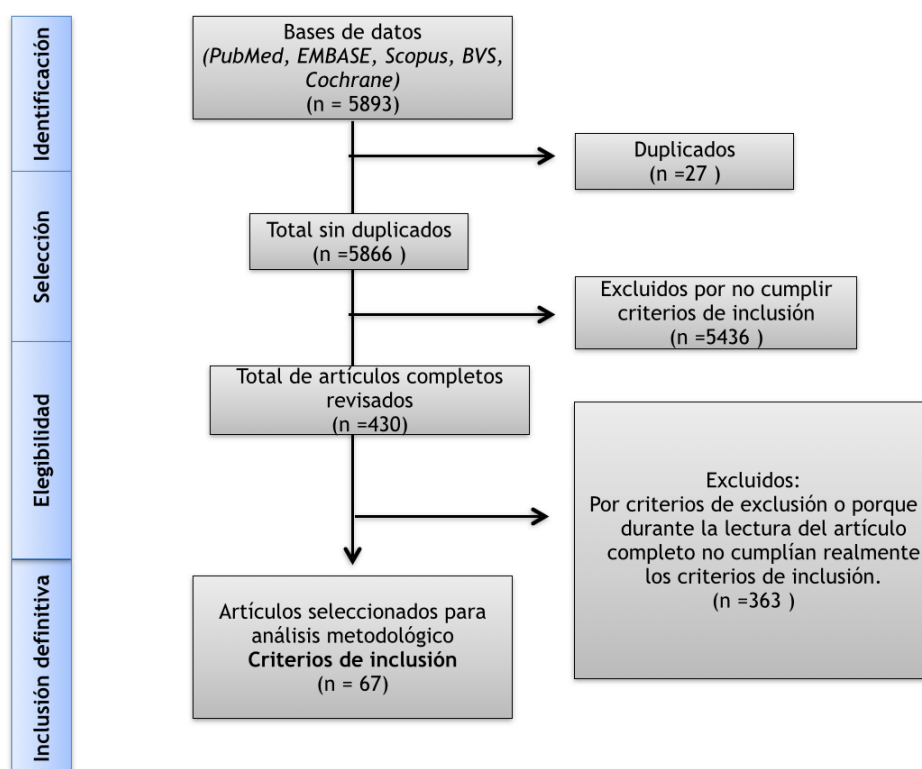
RESULTADOS

RESULTADOS DE LA BUSQUEDA

Se realizó una búsqueda desde Enero a Octubre de 2014 en las bases de datos: *Pubmed*, *Embase*, *Scopus*, *BVS* y *Cochrane*; con los términos MeSH: “*Prenatal diagnosis and cell-free system*”, “*maternal serumscreening test and cell-free system*”, “*prenatal diagnosis and cell-free system and DNA*”, “*prenatal diagnosis and cell-free system and DNA and Fetus*”; los DecCS: *Diagnóstico prenatal y sistema libre de células*, *Diagnóstico Pré-Natal e Sistema Libre de Células*, *Diagnóstico prenatal y sistema libre de células y ADN*, *Diagnóstico Prénatal e Sistema Libre de Células e DNA*, *Diagnóstico prenatal y sistema libre de células y ADN y Feto*, *Diagnóstico Pré-Natal e Sistema Libre de Células e DNA e Feto* y palabras clave: *Cell free fetal DNA and prenatal non invasive diagnosis*, *DNA Fetal Libre Y Diagnóstico Prenatal No Invasivo*, *Dna Libre Fetal e Diagnóstico Pré-Natal Não Invasivo*.

Se encontraron 5,893 resultados que cumplían a los criterios de búsqueda de los cuales 27 eran estudios duplicados (analizados por medio de *EndNote*) y se eliminaron de la base de datos. De los 5,866 artículos totales, 430 cumplieron los criterios de inclusión y 363 fueron excluidos por ser duplicados o por presentar cualquier criterio de exclusión.

Figura 4: Diagrama de árbol de la revisión sistemática de la literatura

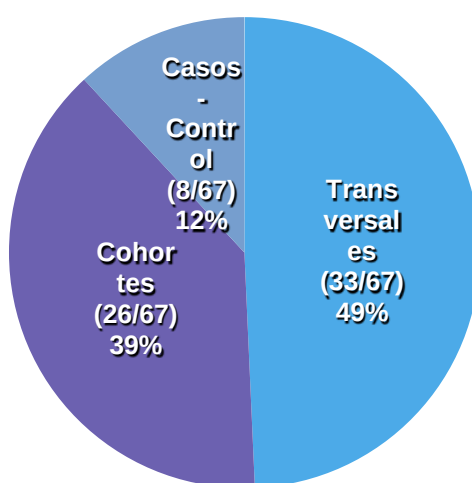


DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS

De un total de 67 estudios incluidos, el 49.3% (33/67) correspondieron a estudios de corte transversal 38,8% (26/67) a estudios de cohortes y el 11.9% (8/67) a estudios casos y controles (Figura. 5).

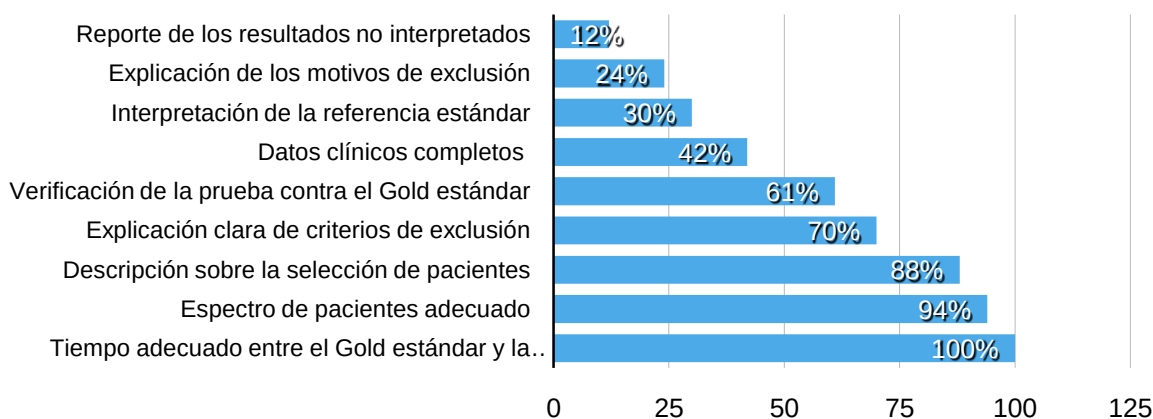
El rango del año de publicación en los estudios comprende desde 1995 hasta el año 2014 con un 27% de las publicaciones en el año 2011.

Figura 5: Tipos de estudios



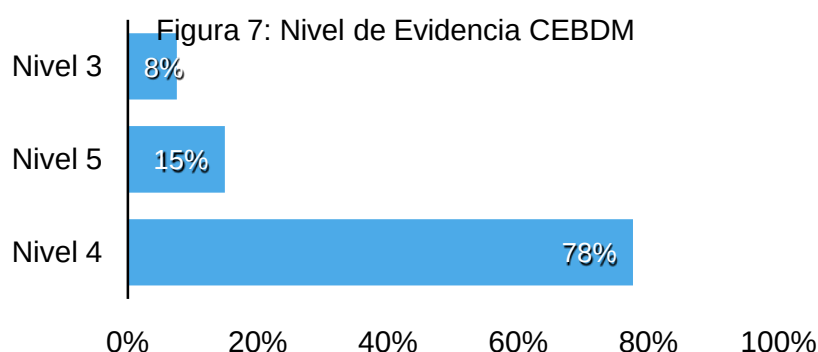
Los niveles de evidencia encontrados en los estudios se pueden observar en las figuras 6 y 7. Solo se incluyeron como fue descrito, estudios nivel 3 en adelante.

Figura 6: Nivel de Evidencia QUADAS



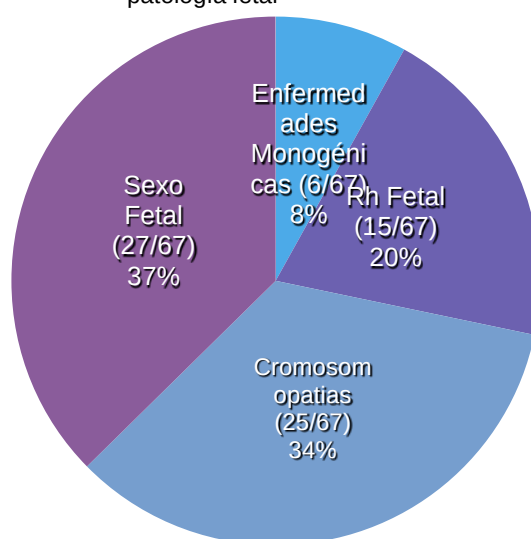
El 31.3% (21/67) de los estudios fueron multicéntricos. La participación por países fue mayor en Estados Unidos y China con un aporte de 15% de los estudios, seguidos de Francia y el Reino Unido con un 7.5%, Suecia, Corea, Irán y Grecia con un 4.5%; el resto de los países incluidos con uno o dos estudios.

De los estudios revisados, se encontró que 24 tuvieron como objetivo la identificación de cromosomopatías. De estos, el cromosoma 21 fue analizado en 15 estudios y los cromosomas 18 y 13 fueron evaluados en 14 y 10 estudios respectivamente. Los cromosomas sexuales (i.e., X y Y) fueron estudiados en 8 artículos, mientras que la cromosomopatía parcial del 9 solo en uno artículo.



SUBCLASIFICACIÓN DE ESTUDIO:

Figura. 8: Distribución de Estudios de acuerdo a patología fetal



CROMOSOMOPATÍAS

Las cromosomopatías evaluadas en los diferentes estudios son: T2, T13, T18, trisomía parcial del 9 y del 13 y alteraciones de los cromosomas sexuales (monosomía del X, XXY y XYY). Los diferentes estudios contaron con poblaciones heterogéneas de alto y bajo riesgo con una medida de edad gestacional para la toma de la muestra de 16 semanas.

El estudio con el menor número de pacientes tenía 13 gestantes y el mayor 2,042. El 90.9% de los estudios tuvieron correlación post-natal y el 9% restante no se cuenta con datos de correlación post-natal pero si hay correlación por métodos invasivos prenatal. El porcentaje de muestras estudiadas sobre el total de incluidas tuvo un rango entre el 54-100% (siendo del 100% en 11 estudios). Para todos los casos se contó con estandarización de la extracción de ADN por medios previamente descritos en la literatura.

Tabla 3. Resultados estudios para cromosomopatías

Autor, Fecha	Técnica utilizada	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
Davalieva K. 2006	RT-PCR	89.2	100	NA	NA
Dhallan R. 2007	PCR con enzimas de restricción y marcación con fluorescencia	66.7	98.2	98.2	66.7
Chen EZ. 2011	GenomeAnalyzer	100	100	NA	NA
Ehrich M. 2011	MPSS	100	99.7	99.7	97.5
Palomaki, 2011	MPSS	98.6	99.7	99.7	98.5
Zhang M. 2011	PCR-MSP y PCR-MSRE	Na	Na	Na	Na
Lau, Tze. 2012	NIFTY™ (PCR+MPS)	Na	Na	Na	Na
Nicolaides K. 2012	DANSR	Na	Na	Na	Na
Norton M. 2012	DANSR, FORTE	100	99.97	Na	Na
Sparks A. 2012	DANSR	Na	Na	Na	Na
Stumm M. 2012	GenomeAnalyzer (MPS)	Na	Na	Na	Na
Zimmerman B. 2012	PCR multiplex + secuenciación	100	100	Na	Na
Ashoor G. 2013	DANSR y FORTE	Na	Na	Na	Na
Gil, M. 2013	Secuenciación cromosoma-selectiva	Na	Na	Na	Na
Lee, Da. 2013	RT-PCR para regiones metiladas	90.0	Na	98.1	41.7
Liang D. 2013	NIFTY™ (PCR+MPS)	100	99.70	100	98.5
Nicolaides K. 2013	PCR multiplex + secuenciación	Na	Na	Na	Na
Nicolaides K. 2013	PCR multiplex + secuenciación	100	100	Na	Na
Song Y. 2013	Secuenciación	Na	Na	Na	Na
Verweij, E. 2013	Secuenciación cromosoma-selectiva	99.4%	99.98	Na	Na
Yuan Y, 2013	Secuenciación (Ion Torrent personal genome machine)	Na	Na	Na	Na
Bianchi D. 2014	Secuenciación	100	99.75%	100	42.7

Autor, Fecha	Técnica utilizada	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
(IlluminaTrusEQdna)					
Bianchi D, 2014	Secuenciación (IlluminaTrusEQdna)	100	Na	100	42.7
Nicolaides K. 2014	DANSR + FORTE	Na	Na	Na	Na

ADN: Acido desoxiribonucleico, DANSR: Análisis Digital de Regiones Seleccionadas, FORTE: Fracción Fetal Optimizada para la Evaluación de Riesgo de Trisomía (del inglés, Fetal-FractionOptimizedRisk of TrisomyEvaluation), PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. MPSS: Secuenciación Masiva Paralela, MSRE-PCR: PCR con enzimas de restricción sensibles a áreas de metilación (del inglés, PCR Methylation-SensitiveRestrictionEnzymeDigestion), NIFTY™: Non-Invasive Fetal Trisomy test, RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa.

En la tabla 3 se pueden ver las diferentes técnicas utilizadas en los estudios para cromosomopatías. Estas van desde técnicas de primera generación hasta técnicas de última generación obteniendo mejores resultados y menor tasa de perdida de muestras (i.e., aquellas que no amplifican y por ende no es posible su análisis) en las técnicas de última generación y en aquellas técnicas que son modificadas frente a las iniciales. Se reportan sensibilidades con rangos entre 66.7-100% así como especificidades entre el 74.5 y 100%. Llama la atención la alta tasa de perdida de datos en los análisis de VPP, VPN, sensibilidad y especificidad. Datos adicionales de los estudios para diagnóstico de cromosomopatías se encuentran en los anexos.

RH FETAL

El 22% (15/67) de los estudios analizados buscaban determinar el Rh fetal Se realizaron secuenciaciones del gen completo en 9 casos, exón 7 en 4 casos, exón 7 en 3 casos y Alelo C, E, Exón 4 y Exón 6 en un caso respectivamente. En un 20% de los estudios no se realizó correlación post-natal pero si se compararon los hallazgos con diagnóstico invasivo prenatal.

Tabla 4. Resultados estudios para Rh fetal

Referencia	Técnica diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
XiaoYan Z, 2001	PCR multiplex + RT-PCR	NA	NA	NA	NA
Legler T. 2002	RT-PCR	98.25	100	NA	NA
Minon JM. 2008	RT-PCR	93.6	100	NA	NA
Hyland C. 2009	RT-PCR	NA	100	NA	NA
Sesarini C. 2009	RT-PCR	94.4	75	90	85
Wang, X.D. 2009	RT-PCR	89.7	NA	NA	NA
Achraguy S.,2010	PCR modificada por Sciellour-Rouillac et al.	Na	Na	96.7	98.7
Günel T. 2010	RT-PCR	100	100	NA	NA
Akilekar R. 2011	PCR	98.2	100	96.5	100
Macher H. 2011	PCR multiplex + RT-PCR	100	98.2	100	98.9
Tounta G, 2011	PCR multiplex con enzimas de restricción	100	96.7	NA	NA

Referencia	Técnica diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
Benachi A. 2012	PCR con amplificación por Light Cycler	100	100	NA	100
Dziegie, MH. 2012	RT-PCR	99.9	NA	NA	NA
Wikman A, 2012	PCR	100	NA	NA	NA
Tiblad E, 2013	PCR exón 4	NA	NA	NA	NA

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

En la tabla 4 se describen las diferentes técnicas usadas para el diagnóstico de Rh fetal; en esta sub-selección de los estudios se evidencia una mayor homogeneidad en la técnica, un 60% usó la RT-PCR para determinar la expresión del gen o de un exón del gen estudiado. Se evidenciaron sensibilidades que varían entre el 86.8-100% con especificidades del 75-100%. Al realizar la extracción de los VPP y VPN se evidencian mayor perdida de datos en estas categorías, en aquellos en los que se encontraban dichos datos, se evidenciaron valores de 90-100% para el VPN y del 85-100% para el VPP. Datos adicionales de los estudios de Rh fetal se encuentran en los anexos.

SEXO FETAL

El 40.2% (27/67) de los estudios extraídos estudiaron sexo fetal, de estos el 96.2% incluyeron dentro del gen de análisis el SRY y en un 51.8% de los estudios se agregó un segundo gen de análisis para mejorar la sensibilidad. La técnica más utilizada fue la RT-PCR en un 44.4% seguida de la Nested-PCR.

Tabla 5. Resultados estudios para sexo fetal

Referencia	Técnica diagnóstica	Gen	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
Van Wijk, 1995	Nested PCR	DYZ1 SRY	NA	NA	NA	NA
Costa JM. 2001	RT-PCR	SRY GALT	100	100	NA	NA
Costa JM. 2001	RT-PCR	SRY	100	100	NA	NA
Chen ZB. 2004	Nested PCR	SRY	97.4	85.7	NA	NA
Zolotukhina, T.V. 2005	Nested PCR	SRY	94.5	87.5	NA	NA
Davalieva K. 2006	RT-PCR	SRY	89.2	100	NA	NA
Santacroce, R. 2006	PCR	SRY Amelogenina	100	100	NA	NA
Liu, Fu. 2007	FQ-PCR	SRY	100	100	NA	NA
Minon JM. 2008	RT-PCR	RHD SRY	100	100	NA	NA
Tungwiwat W, 2008	Nested PCR	Cr. Y (ATL-1)	99.3	100	99.3	100
Sesarini C. 2009	RT-PCR	SRY	97.1	90.9	NA	NA

Referencia	Técnica diagnóstica	Gen	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPN (%)	VPP (%)
Wang, X.D. 2009	RT-PCR	SRY	100	NA	NA	NA
Hill M, 2011	RT-PCR	SRY DYS14 Fase I	97	95.7	NA	NA
		SRY DYS14 Fase II	99	100		
Kim, Shin Young. 2011	GF-PCR	AMELX/Y	98.8	96.3	84.4	82.4
		SRY			84.9	79.8
Kimura M. 2011	PCR	SRY	NA	NA	NA	NA
Kolialexi A. 2011	PCR Multiplex, digestión enzimática para RASSF1A Y ACTB no metilados	SRY DYS14	100	100	NA	NA
Macher H. 2011	RT-PCR	SRY	100	0.982	100	98.9
Mortarino, M. 2011	RT-PCR	SRY DYS14	94	100	93	100
Svecova I. 2011	RT-PCR	SRY	95.4	95.83	95,83	95.45
Zargari M. 2011	Nested PCR	SRY DYS14 DAZ	95.2	98	96.1	97.6
Zargari M, 2011	Nested PCR	SRY DYS14 DAZ	95.2	98	96.1	97.6
Aggeliki K. 2012	PCR multiplex con digestión enzimática para metilación	RASSF1A SRY DYS14 ACTB	100	100	NA	100
Colah R. 2012	RT-PCR	SRY	100	100	NA	100
Lim, Ji. 2012	PCR multiplex	DYS14 GAPDH	Na	100	100	100
White H, 2012	PCR multiplex con digestión enzimática para metilación	RASSF1A SRY DYS14	NA	NA	NA	NA
Khorshid H. 2013	RT-PCR	DYS14 DAZ SRY	100 94.5 97.3	97.3	NA	NA
Mazloom A. 2013	MPS	SRY	NA	NA	NA	NA

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa., DYZ1: Secuencia de 3564 bp EcoR1 que representa el mayor componente de una región específica del cromosoma Y., SRY: Región determinante del sexo en el cromosoma Y., GALT: Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, RHD: Grupo sanguíneo Rhesus, Cr. Y: Cromosoma Y, ALT-1: Alanino-aminotransferasa 1, DYS14: Marcador específico del cromosoma Y, AMELX: Amilogenina FQ-PCR: PCR cuantitativa flourogenica, RASSF1A: Proteína supresora de tumores cardio específica con un dominio Ras, ACTB: Actina beta, DAZ: Gen localizado en el cromosoma Yq11.223, GAPDH: Deshidrogenasa gliceraldehido 3-fosfato

Como se evidencia en la tabla 5, hay una pérdida de datos para sensibilidad y especificidad del 18.5% que corresponde a 10 datos no encontrados y en aquellos estudios que reportan los datos se evidencia una sensibilidad entre el 89.2-100% con una especificidad entre el 85.7-100%. Solo se hallaron datos de VPN y VPP en el 14.8% de los estudios con rangos entre 84.4-100% y 79.8-

100% para el VPN y VPP respectivamente. Datos adicionales de los estudios para sexo fetal se encuentran en los anexos.

ENFERMEDADES MONOGENICAS

El 8.9% (6/67) de los estudios evaluaron enfermedades monogénicas de diferentes tipos como alfa-talasemia, fibrosis quística y hemofilia; en uno de los estudios adicionalmente se diagnostica el sexo fetal dado que la hemofilia es una enfermedad ligada al X y suele ser importante conocer el sexo del feto para determinar el riesgo de enfermedad.

Tabla 6. Resultados estudios para enfermedades monogénicas

Referencia	Técnica diagnóstica	Gen	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Saker A. 2006	ISSET-CF	CFTR	Na	Na
Santacroce, R. 2006	PCR	SRY Amelogenina	100	100
Sirichotiyakul S, 2011	RT-PCR	Alpha talasemia -1	98.4	79.2
Tsui N, 2011	PCR	ZFY ZFX	Na	Na
Yan T, 2011	PCR multiplex	alfa- Globina	100	93.8
Mouawia H. 2012	PCR	CFTR SMA	100	100

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa., ZFY: Proteína de dedos de zinc, ligada al Y, ZFX: Proteína de dedos de zinc, ligada al X, CFTR: Regulador de conductasatransmembranal de fibrosis quística. , SMA: Atrofia muscular espinal proximal

Dentro de esta muestra pequeña de datos se cuenta con análisis de sensibilidad y especificidad para el 66.6% de los estudios con rangos del 98.4-100% y del 79.2-100% respectivamente. No se reportan los datos del VPN y VPP dado que solo se encontró un dato para estos parámetros. Datos adicionales de los estudios para enfermedades monogénicas se encuentran en los anexos.

DISCUSION

Dentro del desarrollo de la medicina prenatal, se busca encontrar un diagnóstico temprano y certero que permita a las parejas gestantes la toma de decisiones informadas. En esta búsqueda, dentro de la historia hemos pasado por la amniocentesis, BVC y tamizaje genético; los cuales ya han sido previamente revisados en la literatura⁽¹⁾. Hoy por el descubrimiento de células fetales en sangre materna es posible la detección temprana de patología fetal sin el riesgo derivado de intervención por medio del diagnóstico prenatal invasivo⁽⁷²⁾.

Desde su descubrimiento, múltiples reportes se han descrito en la literatura mostrando un aumento del ADN libre en sangre materna en embarazos con trisomía 12 al compararlos con gestaciones sin alteraciones numéricas cromosómicas⁽⁶⁴⁾. Adicionalmente, es un método diagnóstico ya aceptado por la ACOG para patologías de alto y bajo riesgo con ciertas indicaciones descritas⁽⁷³⁾. Es por esto que se planteó la pregunta de investigación sobre su utilidad para el diagnóstico de patología fetal en embarazos de alto y bajo riesgo, con el objetivo de obtener esta respuesta mediante la elaboración de una revisión sistemática.

En la presente revisión sistemática cabe resaltar la alta prevalencia de estudios tipo transversal, los cuales correspondieron al 49.3% de todos los estudios incluidos, con una distribución homogénea en años de publicación desde 1995 hasta 2014 salvo por el año 2011, donde se muestra un aumento en las publicaciones de este tema con una participación del 27%; lo cual se correlaciona con el año en el cual se inicia la implementación de la técnica dentro de la práctica clínica. Aquellos estudios seleccionados cuentan con un adecuado nivel de evidencia según el CEDBM⁽⁶⁹⁾; llama la atención que al realizar la segunda evaluación de calidad por medio del QUADAS⁽⁷⁰⁾ se tiene un adecuado espectro y selección de los pacientes y además cumplen con un tiempo adecuado entre la realización de la prueba y el gold standard pero casi la totalidad de estudios quedan cortos en aportar datos frente a la interpretación de resultados, datos clínicos completos, y causales de exclusión.

Esta diferencia de resultados entre los dos métodos de evaluación podría ser el responsable de un sesgo de información que se había controlado previamente mediante la búsqueda exhaustiva de los datos suministrados dentro de los artículos y a través de los autores, obteniendo así la mayor cantidad de información clínica sobre los pacientes. En estos puntos cabe aclarar que los estudios en pacientes gestantes cuentan con múltiples puntos de heterogeneidad en cuanto a la selección de pacientes y variables a medir, sin contar el difícil seguimiento de estas cohortes por la posibilidad de terminación de embarazo temprano en pacientes con diagnóstico de patologías fetales y con pérdida en algunos casos de la información de las pacientes⁽⁷⁴⁾.

La mayoría de los estudios se realizaron en regiones que comprenden Norte América y Europa, debido a su desarrollo económico y científico que permiten la implementación de estas técnicas novedosas; adicionalmente esta localización geográfica de las publicaciones se podría deber a un sesgo de publicación dado que es claramente descrito en la literatura las barreras que presentan estudios de países en vía de desarrollo para su publicación⁽⁷⁷⁾. Este sesgo se controló previamente mediante la búsqueda de literatura gris.

Esta predilección geográfica de los estudios, no presenta riesgo adicional en la presente revisión sistemática pues salvo para poblaciones específicas, poblaciones en desequilibrio de Hardy Weinberg o en países Nórdicos la incidencia de trisomía y enfermedades genéticas no presenta grandes fluctuaciones; salvo para la T21 en aquellos países donde la población gestante cuenta con edad materna avanzada lo cual genera un aumento del riesgo de tres veces para esta patología⁽⁷⁶⁾.

Dada la heterogeneidad de los datos se realizó una sub-clasificación de estos de acuerdo a la patología estudiada (i.e., trisomías, enfermedad monogénica, determinación de sexo fetal y determinación de Rh fetal). Una tercera parte de los estudios corresponden a estudio de trisomías (i.e., cromosoma 9, 13, 18, 21 y sexuales), ya que estas patologías son frecuentemente estudiadas en la literatura médica dada su prevalencia^(15,17).

La técnica molecular más usada es la secuenciación por el método de Sanger, la cual hoy en día es la técnica madre de la secuenciación del DNA posterior a su descubrimiento por Frederick Sanger en 1977⁽¹⁷⁾ mostrando su auge en los últimos años, sin embargo actualmente hay una tendencia a ser reemplazada por nuevas técnicas de siguiente generación mediante las cuales se obtienen diagnósticos más precisos y en un menor tiempo.

El inicio de la aplicación de cffDNA reporta sensibilidades que varían desde el 80-100% con mejora de esta al estandarizar los procedimientos; teniendo en los reportes científicos actuales una sensibilidad del 98.6-100%⁽⁷⁷⁾. La presente revisión sistemática por sus amplios rangos de fechas reporta sensibilidades que varían entre el 80-100% acorde con lo descrito previamente y con un valor extremo del 66.7% en un estudio que realiza estudio de SNPs en 60 pacientes sin secuenciación total. Cabe aclarar que este estudio no realiza *TagSNPs* para la selección de los SNPs generando un sesgo de selección y adicionalmente no es posible determinar si la muestra es representativa o no para la muestra. Con el aumento en la sensibilidad gracias a la estandarización de las técnicas y adecuada selección de pacientes se garantiza una mejor precisión diagnóstica frente a los otros métodos invasivos o no invasivos disminuyendo así el uso de dos métodos para el diagnóstico (tamizaje + método invasivo)⁽⁷⁸⁾.

En los estudios que evaluaron Rh fetal y sexo fetal, se evidencian poblaciones más homogéneas con un uso de pocas técnicas probablemente por exigencias propias de los genes a secuenciar. Ambos sub-grupos de pacientes presentan sensibilidades que varían entre el 90-100%; y que se correlacionan con las reportadas en la literatura (i.e., 97.2% para sexo fetal y del 99% para Rh fetal)⁽⁷⁹⁾.

En el diagnóstico prenatal es de especial importancia el abordaje de las pacientes con falsos positivos o falsos negativos dado la implicación que este podría tener en la gestación. Lo cual requiere que sean disminuidos al máximo para no generar falsas expectativas o diagnóstico que podría ser devastadores para una pareja, por esta razón todo resultado positivo debe ser confirmado por métodos invasivos y exámenes complementarios.

En la presente revisión sistemática el estudio para enfermedades monogénicas no arroja datos relevantes principalmente por la escasa muestra obtenida para estas patologías (i.e., solo 8.9% del total de estudios) y la heterogeneidad de patologías que evaluó cada una, siendo estas no equiparables entre sí. Los estudios al analizarse por separado reportan altas tasas de correlación diagnóstica; lo cual podría sugerir el uso de esta técnica para patologías monogénicas. Esta afirmación requiere una mayor profundización científica por medio de estudios para cada patología que demuestren su eficacia.

De acuerdo a lo anterior, se abren nuevas líneas de investigación para determinar el patrón de referencia del método diagnóstico, y requerimientos técnicos para el diagnóstico con cffDNA con posterior generación de guías clínicas. Adicionalmente, sería interesante plantear como el uso de esta técnica en un país como el nuestro en vía de desarrollo podría generar ahorro en el sistema de salud, ya que representaría una ganancia respecto a costo beneficio usando en el tamizaje genético menos pruebas y de esta manera reducirían los costos de manera significativa. La anterior afirmación, solo es posible determinarla mediante un estudio de costo-efectividad.

Los hallazgos obtenidos mediante el presente estudio permiten determinar que el

diagnósticogenético prenatal no invasivo para cromosomopatías, Rh fetal, Sexo fetal y enfermedades monogénicas a través del estudio de cffDNA es útil en la mayoría de los casos y con gran exactitud, esto ha sido posible confirmarlo mediante diagnóstico postnatal o mediante métodos invasivos, además de demostrar que al utilizar un método no invasivo se reducen drásticamente las complicaciones derivadas de las técnicas invasivas tales como infecciones, lesiones fetales y pérdida fetal principalmente que pueden llegar a presentarse hasta en 2.4% de los casos.

CONCLUSIONES

En la presente revisión sistemática, se evidencia como el diagnóstico prenatal no invasivo es una técnica feasible, reproducible y sensible para el diagnóstico fetal, evitando el riesgo al cual son expuestos las madres y fetos al optar por un diagnóstico invasivo. La técnica y sus aplicaciones han sido evaluadas durante años en múltiples estudios con resultados adecuados como los descritos; lo cual podría sugerir su futura implementación en el programa de control prenatal en las mujeres de alto y bajo riesgo, ampliando así la indicación actual del ACOG quien lo recomienda en población de alto riesgo.

Adicionalmente, sería importante la realización de un estudio de costos para países del tercer mundo como el nuestro, donde la implementación de estas técnicas novedosas generalmente requiere de tiempo e inversiones económicas importantes, pero que de ser demostrado por su costo-eficacia se podría introducir en el esquema de control prenatal de las pacientes Colombianas reduciendo así la tasa de diagnósticos errados y posiblemente la mortalidad materna derivada de las complicaciones secundarias a una gestación de alto riesgo por alteración fetal.

Cabe resaltar la importancia a futuro de la realización de un meta-análisis cuando se cuenten con más estudios complementarios para poder determinar el verdadero impacto de esta muestra en una población más globalizada y no en una población específica donde el impacto de las alteraciones genéticas de la población difieran en su presentación para cada área geográfica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dey, M., Agarwal, S., & Sharma, S. (2013). NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS: A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 4(4).
2. Guibert, J. (2003). Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(8), 1733–1736. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq320>
3. Lo, Y. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485-487.
4. Macek Sr, (Ed.) Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Karolinum Press, Prague, Czech Republic; 2002: 96–102
5. Krabchi, K., Gros-Louis, F., Yan, J., Bronsard, M., Masse, J., Forest, J. C., & Drouin, R. (2001). Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clinical genetics*, 60(2), 145-150.
6. LO, Y., TEIN, M., LAU, T., HAINES, C., LEUNG, T., POON, P., et al. (1998). Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*, 62(4), 768–775. <http://doi.org/10.1086/301800>
7. Hill, M., Finning, K., Martin, P., Hogg, J., Meaney, C., Norbury, G., ... & Chitty, L. S. (2011). Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clinical genetics*, 80(1), 68-75.
8. Nygren, A. O. H., Dean, J., Jensen, T. J., Kruse, S., Kwong, W., van den Boom, D., & Ehrich, M. (2010). Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clinical Chemistry*, 56(10), 1627–1635. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2010.146290>
9. Kimura, M., Hara, M., Itakura, A., Sato, C., Ikebuchi, K., & Ishihara, O. (2011). Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. *Nagoya journal of medical science*, 73(3-4), 129-135.
10. Fuks, A. M., & Hsu, C.-D. (2005). Prenatal Diagnosis using Fetal Genetic Material in Maternal Circulation. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 44(1), 8–15. [http://doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60100-5](http://doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60100-5)
11. Group, T. N. P. S. W. (2013). ACOG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genetics in Medicine*, 15(5), 395-398. Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet* 1998;352:343 Fir
12. Currier R, Wu N, Van Meter K, et al. Integrated and first trimester prenatal screening in California: program implementation and patient choice for follow-up services. *Prenat Diag* 2012;32: 1077–83.
13. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, et al. UK multicentre Project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Fetal*
14. Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet* 1998;352:343–6.
15. Ball, R. H., Caughey, A. B., Malone, F. D., Nyberg, D. A., Comstock, C. H., Saade, G. R., ... & D'Alton, M. E. (2007). First-and second-trimester evaluation of risk for Down syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 110(1), 10-17.
16. Norton, M. E., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., Laurent, L. C., Caughey, A. B., ... & Song, K. (2012). Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *American journal of obstetrics and gynecology*, 207(2), 137-e1.
17. Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., & Nicolaides, K. H. (2012). Chromosome-selective sequencing of maternal plasma celltion (NICE) Studrst-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *American journal of obstetrics and gynecology*, 206(4), 322-e1.

18. Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., & Nicolaides, K. H. (2012). Chromosome-selective sequencing of maternal plasma celltion DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *American journal of obstetrics and gynecology*, 206(4), 322-e1.
19. Palomaki, G. E., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Ehrich, M., ... & Canick, J. A. (2011). DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in medicine*, 13(11), 913-920.
20. Dan, S., Wang, W., Ren, J., Li, Y., Hu, H., Xu, Z., ... & Zhang, X. (2012). Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenatal diagnosis*, 32(13), 1225-1232.
21. Walknowska, J., Conte, F., & Grumbach, M. (1969). Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *The Lancet*, 293(7606), 1119-1122.
22. DataBank Error Page. (n.d.). Retrieved December 13, 2014, from <http://databank.worldbank.org/data/views/reports/tableview.aspx>, fecha de búsqueda enero 31 de 2015.). Tiene una mortalidad en niños menores de 11.4 por cada 1,000 nacidos para el año 2012 (<http://www.asivamosensalud.org/inidicadores/estado-de-salud/grafica.ver/7>
23. Schaeffer, A. J., Chung, J., Heretis, K., Wong, A., Ledbetter, D. H., & Martin, C. L. (2004). Comparative genomic hybridizationa Provincia de Ubaté, Colombia. 015.). Tiene una mortalidad en niños menores de 11.4 por cada 1,000 nacidos para eThe American Journal of Human Genetics, 74(6), 1168-1174.
24. (n.d.). Retrieved December 14, 2014, from <http://omim.org/statistics/entry>
25. Chen, C. P., Wu, P. C., Lin, C. J., Chern, S. R., Tsai, F. J., Lee, C. C., ... & Wang, W. (2011). Unbalanced reciprocal translocations at amniocentesis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 50(1), 48-57.
26. NAZER, J., & CIFUENTES, L. (2011). Estudio epidemiológico global del síndrome de Down. *Revista chilena de pediatría*, 82(2), 105-112.
27. VILLEGAS, J. B., & OBANDO, F. S. (2008). La carga de la enfermedad genética en Colombia, 1996-2025. *Univérsitas Médica*, 49(1), 12-28.
28. Páez, P., Suárez-Obando, F., & Zarante, I. (2008). Enfermedades de origen genético en pacientes pediátricos hospitalizados en la Provincia de Ubaté, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 10(3), 414-422.
29. Nassbaum, R., Melness, R., & Willant, H. (n.d.). Capítulo 5. In *Principios de citogenética clínica»* (Séptima ed., pp. 68-75). Thompson & Thompson.
30. Fact Sheet 8: Autosomal Recessive Inheritance. (n.d.). Retrieved December 14, 2014, from <http://www.genetics.edu.au/Publications-and-Resources/Genetics-Fact-Sheets/FactSheet8/view>
31. Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics. (n.d.). Retrieved December 10, 2014, from <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>
32. Lay-Son, G., & Repetto, G. (2010). Genética y fibrosis quística: desde el gen CFTR a los factores modificadores. *Neumología pediátrica*, 5, 4-9.
33. Malambo, D., Gómez, D., Veloza, L., Arbeláez, J., & Gómez, C. (2008). Algunos aspectos hereditarios y ambientales en casos de fibrosis quística en la ciudad de Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte. Barranquilla (Col)*, 24, 10-22.
34. Ortigosa, L. (2007). Fibrosis quística. Aspectos diagnósticos. *Colombia Médica*, 38(1 Supl 1).
35. Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M. A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., ... & Girodon, E. (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders–updated European recommendations. *European journal of human genetics*, 17(1), 51-65.
36. Ogino, S., & Wilson, R. B. (2004). Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics.
37. Stewart, H., Wallace, A., McGaughran, J., Mountford, R., & Kingston, H. (1998). Molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Archives of disease in childhood*, 78(6), 531-535.
38. Steinberg, M. H., & Adewoye, A. H. (2006). Modifier genes and sickle cell anemia. *Current opinion in hematology*, 13(3), 131-136.

39. De las Heras, F. S., & Pérez, H. L. (2008, February). [Hemoglobinopathies diagnosed at the University Hospital Ntra. Sra. de Candelaria and its area of reference in Santa Cruz de Tenerife during one year]. In *Anales de medicina interna (Madrid, Spain: 1984)* (Vol. 25, No. 2, pp. 61-66).
40. Rosero María Jimena, Bermúdez Antonio José. Análisis de hemoglobinopatías en regiones afrocolombianas usando muestras de sangre seca de cordón umbilical. *Acta Med Colomb* [serial on the Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Apr 26] ; 37(3): 117-126. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482012000300003&lng=en.
41. ACOG Committee on Practice Bulletins. (2007). ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol*, 109, 217-227.
42. Armengol, L., Nevado, J., Serra-Juhé, C., Plaja, A., Mediano, C., García-Santiago, F. A., ...& Pengol, L., Nevado, J., Serra-Juhé, C., Plaja, A., Mediano, C., García-Santiago, F. A., ... al chromosomal abnor*Human genetics*, 131(3), 513-523.
43. De los Ángeles Mori, M., Mansilla, E., García-Santiago, F., Vallespín, E., Palomares, M., Martín, R., ...& Nevado, J. (2012). Diagnóstico prenatal y array-hibridación genómica comparada (CGH)(I). Gestaciones de elevado riesgo. *Diagnóstico Prenatal*, 23(2), 34-48.
44. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, et al. 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;206:319.e1–9.
45. Lo, Y. M., Lo, E. S., Watson, N., Noakes, L., Sargent, I. L., Thilaganathan, B., & Wainscoat, J. S. (1996). Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*, 88(11), 4390-4395.
46. Bianchi, D. W., Flint, A. F., Pizzimenti, M. F., Knoll, J. H., & Latt, S. A. (1990). Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3279-3283.
47. Simpson, J. L., & Elias, S. (1993). Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *Jama*, 270(19), 2357-2361.
48. Lo, Y. D., & Chiu, R. W. (2007). Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), 71-77.
49. Cheung, M. C., Goldberg, J. D., & Kan, Y. W. (1996). Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature genetics*, 14(3), 264-268.
50. Krabchi, K., Gadji, M., Samassekou, O., GrW. (1996). PrenForest, J. C., & Drouin, R. (2006). Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. *Prenatal diagnosis*, 26(1), 28-34.
51. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ and Anker P (2000) *The origin and mechanism of circulating DNA*.
52. Ann NY Acad Sci906, 161–168. Chen, X. Q., Stroun, M., Magnenat, J. L., Nicod, L. P., Kurt, A. M., Lyautey, J., ... & Anker, P. (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature medicine*, 2(9), 1033-1035.
53. Wong, I. H., Lo, Y. D., Zhang, J., Liew, C. T., Ng, M. H., Wong, N., ... & Johnson, P. J. (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer research*, 59(1), 71-73.
54. Anker, P., Lefort, F. R. A. N. C. O. I. S., Vasioukhin, V. A. L. E. R. I., Lyautey, J. A. C. Q. U. E. L. I. N. E., Lederrey, C. H. R. I. S. T. I. N. E., Chen, X. Q., ... & Farthing, M. J. (1997). K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 112(4), 1114-1120.
55. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
56. Lo, Y. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076),

485-487.

57. Lo, Y. D., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., ... & Hjelm, N. M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*, 62(4), 768-775.
58. Smid, M., Lagona, F., de Benassuti, L., Ferrari, A., Ferrari, M., & Cremonesi, L. (1999). Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clinical chemistry*, 45(9), 1570-1572.
59. Lau, T. K., Chen, F., Pan, X., Pooh, R. K., Jiang, F., Li, Y., ... & Zhang, X. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(8), 1370-1374.
60. Faas, B. H. W., Beuling, E. A., Christiaens, G. M., & von dem Borne, A. K. (1998). Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *The lancet*, 352(9135), 1196.
61. Bischoff, F. Z., Nguyen, D. D., Marquitaens, G. M., & von de, Simpson, J. L., & Elias, S. (1999). Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 6(2), 64-69.
62. Amicucci, P., Gennarelli, M., Novelli, G., & Dallapiccola, B. (2000). Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 46(2), 301-302.
63. Chen, C. P., Chern, S. R., & Wang, W. (2000). Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenatal diagnosis*, 20(4), 355-357.
64. Lo, Y. D., Lau, T. K., Zhang, J., Leung, T. N., Chang, A. M., Hjelm, N. M., ... & Bianchi, D. W. (1999). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical chemistry*, 45(10), 1747-1751.
65. van Wijk, I. J., de Hoon, A. C., Jurhawan, R., Tjoa, M. L., Griffioen, S., Mulders, M. A., ... & Oudejans, C. B. (2000). Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clinical chemistry*, 46(5), 729-731.
66. Lo, Y. D., Leung, T. N., Tein, M. S., Sargent, I. L., Zhang, J., Lau, T. K., ... & Redman, C. W. (1999). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clinical chemistry*, 45(2), 184-188.
67. Al-Mufti, R., Hambley, H., Albaiges, G., Lees, C., & Nicolaides, K. H. (2000). Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Human reproduction*, 15(7), 1624-1628.
68. Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Golaides, K. H. (2000). Increased fe.. & Moher, D. (2009). The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Annals of internal medicine*, 151(4), W-65.
69. Medicine, O. C. F. E.-B. (2011). CEBM Levels of Evidence Table. *The Oxford Levels of Evidence*.
70. Whiting, P., Rutjes, A. W., Reitsma, J. B., Bossuyt, P. M., & Kleijnen, J. (2003). The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC medical research methodology*, 3(1), 25.
71. Resolución, N. 008430 Del 4 De Octubre De 1993. *Ministerio de salud*.
72. Driscoll, D. A., & Gross, S. (2009). Prenatal screening for aneuploidy. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2556-2562.
73. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2012). Committee opinion no. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*, 120(6), 1532-1534.
74. Greene, N., Greenland, S., Olsen, J., & Nohr, E. A. (2011). Estimating bias from loss to follow-up in the Danish National Birth Cohort. *Epidemiology*, 22(6), 815-822.
75. Langer, A., Díaz-Olavarrieta, C., Berdichevsky, K., & Villar, J. (2004). Why is research from developing countries underrepresented in international health literature, and what can be done about it?. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(10), 802-803.

76. Loane, M., Morris, J. K., Addor, M. C., Arriola, L., Budd, J., Doray, B., ... & Dolk, H. (2013). Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *European Journal of Human Genetics*, 21(1), 27-33.
77. Norwitz, E. R., & Levy, B. (2013). Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 6(2), 48.
78. Song, K., Musci, T. J., & Caughey, A. B. (2013). Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high-risk women based on a US population. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(12), 1180-1185.
79. Wright, C. F., & Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update*, 15(1), 139-151.

ANEXOS

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERES DE INVESTIGADORES

DATOS PERSONALES

Nombre: María del Rosario Forero

Correo electrónico: forero.maria@urosario.edu.co

Teléfono: 312 3053049

Institución en la que trabaja: Bayer S.A.

Institución que le vincula a la revisión sistemática: Ninguna

Rol en la Investigación: Investigadora

DECLARACIÓN DE INTERES:

De acuerdo a los criterios del instrumento AGREE y las normas del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.wame.org/urmespanol.pdf/>), es necesario comunicar por escrito la existencia de alguna relación entre los autores del artículo y cualquier entidad pública o privada de la cual se pudiera derivar algún posible conflicto de interés.

Un potencial conflicto de interés puede surgir de distintos tipos de relaciones, pasadas o presentes, tales como labores de contratación, consultoría, inversión, financiación de la investigación, relación familiar, etc., que pudiera ocasionar un sesgo no intencional en el trabajo. Teniendo en cuenta que durante el desarrollo de la revisión sistemática pueden surgir nuevos conflictos de interés, le agradecemos diligenciar el formulario nuevamente, si se ha presentado un nuevo interés que necesite ser declarado y al final del desarrollo de la revisión sistemática.

Intereses no personales: No ☒X_____ Si _____

Firma: _____

Fecha: Marzo 1 de 2014

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERES DE INVESTIGADORES

DATOS PERSONALES

Nombre: Ana Maria Perez

Correo electrónico: perez.ana@urosario.edu.co

Teléfono: 320-9162570

Institución en la que trabaja: Estudiante tiempo completo

Institución que le vincula a la revisión sistemática: Ninguna

Rol en la Investigación: Investigadora

DECLARACIÓN DE INTERES:

De acuerdo a los criterios del instrumento AGREE y las normas del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.wame.org/urmespanol.pdf/>), es necesario comunicar por escrito la existencia de alguna relación entre los autores del artículo y cualquier entidad pública o privada de la cual se pudiera derivar algún posible conflicto de interés.

Un potencial conflicto de interés puede surgir de distintos tipos de relaciones, pasadas o presentes, tales como labores de contratación, consultoría, inversión, financiación de la investigación, relación familiar, etc., que pudiera ocasionar un sesgo no intencional en el trabajo. Teniendo en cuenta que durante el desarrollo de la revisión sistemática pueden surgir nuevos conflictos de interés, le agradecemos diligenciar el formulario nuevamente, si se ha presentado un nuevo interés que necesite ser declarado y al final del desarrollo de la revisión sistemática.

Intereses no personales: No __X__ Si _____

Firma: 

Fecha: 1/Marzo/2015

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERES DE INVESTIGADORES

DATOS PERSONALES

Nombre: Nicole Valderrama Beltrán

Correo electrónico: nickyval07@hotmail.com

Teléfono: 3132935175

Institución en la que trabaja: Universidad del Bosque

Institución que le vincula a la revisión sistemática: Ninguna

Rol en la Investigación: Investigadora

DECLARACIÓN DE INTERES:

De acuerdo a los criterios del instrumento AGREE y las normas del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.wame.org/urmespanol.pdf/>), es necesario comunicar por escrito la existencia de alguna relación entre los autores del artículo y cualquier entidad pública o privada de la cual se pudiera derivar algún posible conflicto de interés.

Un potencial conflicto de interés puede surgir de distintos tipos de relaciones, pasadas o presentes, tales como labores de contratación, consultoría, inversión, financiación de la investigación, relación familiar, etc., que pudiera ocasionar un sesgo no intencional en el trabajo. Teniendo en cuenta que durante el desarrollo de la revisión sistemática pueden surgir nuevos conflictos de interés, le agradecemos diligenciar el formulario nuevamente, si se ha presentado un nuevo interés que necesite ser declarado y al final del desarrollo de la revisión sistemática.

Intereses no personales: No ☒X_____ Si _____

Firma: _____

Fecha: _____

Administración

Recursos Humanos y Tecnológicos:

Recursos Humanos			
Personas	Tiempo	Grado Formación	Límite máximo salarios mínimos legales
Investigador 1	10 h/semana	Estudiante de Maestría y Postgrado. Médico graduado.	Hasta 5 salarios
Investigador 2	10 h/semana	Médico graduado con post grado. Estudiante de post grado.	Hasta 5.5 salarios
Investigador 3	10 h/semana	Médico graduado. Estudiante de post grado.	Hasta 5 salarios
Tutor	2 h/ semana		

Recursos Financieros	
Rublos y Renglones	Honorarios
Estadístico	Estimado 800.000 que solo serán necesarios en caso de datos meta-analizables.
Investigadores	9.000.000
Material Bibliográfico	300.000
Material Fungible	200.000
Papelería	
Costo de Publicación	100.000
Varios	300.000
TOTAL	11.600.000

La totalidad de los costos financieros de la investigación será cubierta por los investigadores.

Recursos tecnológicos:

Cada investigador trabajó en su computador personal para la recolección de datos, escritura del material científico y búsqueda de artículos.

Para los análisis estadísticos será utilizado SPSS con la licencia del Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario; en caso de encontrar datos meta-analizables.

Infraestructura

La investigación será realizada en la biblioteca de la universidad así como en las viviendas de los investigadores por lo cual no se requirieron recursos de infraestructura.

Tiempo

Se realizó la presente investigación en un total de 9 meses, durante el cual ningún investigador o asesor metodológico cobró por su intervención en la investigación.

CRONOGRAMA

Tabla 4									
CRONOGRAMA	MESES								
Actividades	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
Búsqueda de literatura									
Diseño del protocolo									
Selección de estudios									
Extracción de datos									
Proceso de verificación y digitación de la información									
Limpieza y verificación de datos									
Análisis de los datos									
Generación de conclusiones e informe final									