



TRABAJO FIN DE GRADO:

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL
MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL EXOMA
COMPLETO**

Curso Académico 2020/2021

ALUMNA: M^a PAZ CALDERÓN PÉREZ

TUTORA: PILAR MÉNDEZ PÉREZ

1.-ÍNDICE:

1.-ÍNDICE:	2
2.-ÍNDICE DE ABREVIATURAS:	3
3.-RESUMEN:.....	4
4.-SUMMARY:	5
5.-INTRODUCCIÓN:.....	6
5.1.-TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL	6
5.2.-TÉCNICA DE WES PRENATAL	7
5.3.-ALGUNAS RECOMENDACIONES DEL AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (ACMG):.....	9
5.4.-OBJETIVOS:.....	10
6.-METODOLOGÍA:.....	10
7.-RESULTADOS:	10
7.1.-EFICACIA DE LA WES PRENATAL SEGÚN LOS ESTUDIOS REVISADOS:.....	10
7.2.-FACTORES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO CON WES:	31
7.3.-BENEFICIOS Y LIMITACIONES DE WES:.....	33
7.3.1.- <i>Beneficios:</i>	33
7.3.2.- <i>Retos y limitaciones:</i>	35
7.4.-RESULTADOS DE WES PRENATAL EN EL C.H.U.B.	36
8.-DISCUSIÓN:.....	41
9.-CONCLUSIÓN:.....	45
10.-BIBLIOGRAFÍA:.....	46

2.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

- **aCGH**: Hibridación genómica comparativa basada en array.
- **ACMG**: Colegio Americano de Genética Médica.
- **CMA**: Análisis de micromatrices cromosómicas.
- **FISH**: Hibridación fluorescente in situ.
- **HAD**: Herencia autosómica dominante.
- **HAR**: Herencia autosómica recesiva.
- **NGS**: Secuenciación de nueva generación.
- **QF-PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- **SNP**: Polimorfismo de nucleótido único.
- **TN**: Translucencia nual.
- **VOUS**: Variantes de significado incierto.
- **WES**: Secuenciación del exoma completo.
- **WGS**: Secuenciación del genoma completo.

3.-RESUMEN:

La secuenciación del exoma completo (WES) es una técnica desarrollada recientemente con la que se pretende obtener información relevante sobre la parte codificante del genoma, es decir, sobre los exones, que posteriormente se traducirán en proteínas. Esta técnica resulta muy eficiente, ya que, aunque el exoma supone únicamente un 1-2 por ciento del genoma, es sin embargo el responsable de un ochenta y cinco por ciento de las mutaciones que causan anomalías congénitas (Hillman et al., 2015). Esta técnica está ya avalada por numerosos estudios a gran escala en el periodo postnatal, tanto para la edad pediátrica como para los adultos. A pesar de ello, su utilidad para aumentar el rendimiento diagnóstico en la etapa prenatal está todavía en estudio, siendo este un tema candente en el campo de la genética clínica. En este trabajo pretendemos realizar una revisión bibliográfica de los estudios sobre la técnica de WES prenatal que hemos considerado más relevantes y que han sido publicados en los últimos siete años, analizando la evolución de la información que proporcionan por orden cronológico y tratando de aportar un eslabón más en la cadena de conocimiento sobre esta técnica en el periodo prenatal, que todavía se está conformando. Trataremos de introducir datos sobre cómo esta técnica mejora la posibilidad diagnóstica en comparación con los métodos utilizados tradicionalmente, para así poder tener una perspectiva más clara sobre su eficacia actual y sobre la potencia futura que la WES podrá tener en diferentes áreas de la pediatría. Tras este apartado, este trabajo recogerá información sobre cómo el uso actual de la técnica de WES prenatal en el CHUB está aportando un mayor rendimiento diagnóstico y supone una potente herramienta para hallar soluciones en aquellos casos que no pueden resolverse con las pruebas genéticas tradicionales.

Palabras clave:

Secuenciación del exoma completo, exones, diagnóstico prenatal, anomalías congénitas, ecografía, pediatría.

4.-SUMMARY:

Whole exome sequencing (WES) is a technique developed recently to obtain relevant information about the coding part of the genome, that is, about exons, which will later be translated into proteins. This technique is extremely efficient, since, although the exome accounts for only 1-2% of the genome, it is nevertheless responsible for 85% of the mutations that cause congenital abnormalities (Hillman et al., 2015). This technique is already endorsed by numerous large-scale studies in the postnatal period, for both pediatric and adulthood. Despite this, its usefulness to increase diagnostic performance in the prenatal stage is still under study, being this a burning issue in the field of clinical genetics. In this paper we intend to carry out a bibliographic review of the studies on the prenatal WES technique that we have considered most relevant and that have been published in the last seven years, analyzing the evolution of the information they provide in chronological order and trying to provide another link in the knowledge chain about this technique in the prenatal period, which is still developing to this day. We will try to introduce data on how this technique improves the diagnostic possibility compared to traditional methods, in order to have a clearer perspective on its current efficacy and on the future potential that WES may have in different areas of pediatrics. After this section, this work will gather information on how the current use of the prenatal WES technique in the Maternal and Child Hospital of the city of Badajoz is providing greater diagnostic performance and is a powerful tool to find solutions in those cases that cannot be solved by traditional genetic testing.

Keywords:

Whole exome sequencing, prenatal diagnosis, exons, congenital abnormalities, ultrasonography, pediatrics.

5.-INTRODUCCIÓN:

5.1.- TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

Ha habido un importante desarrollo de las técnicas de diagnóstico prenatal desde la primera vez que estas pudieron ofrecerse, hace aproximadamente sesenta años. Con el desarrollo de nuevas técnicas invasivas para la obtención de muestras fetales, como la amniocentesis o la toma de muestras de vellosidades coriónicas, se abrió la posibilidad de avanzar en la investigación de pruebas citogenéticas y de biología molecular, y se desarrollaron de esta forma pruebas de diagnóstico genético como la hibridación genómica comparativa (Array CGH) o la secuenciación del exoma o del genoma completo fetal.

Aproximadamente entre un dos y un tres por ciento de los embarazos se ven afectados por anomalías estructurales fetales visualizadas mediante ecografía prenatal. Tras la toma de muestras fetales, existen varias pruebas de diagnóstico genético a realizar: destacamos el cariotipo tradicional (resolución de entre 5-10 Mb), que encuentra un diagnóstico genético en un 5-15 por ciento de los casos, la técnica de Hibridación fluorescente in situ (FISH), que identifica trisomías en un treinta por ciento de los fetos dismórficos (no se realiza en nuestro medio), y el Array CGH (resolución de 0,2 Mb, y aquí, en el CHUB, resolución de 60 Kb), que es una técnica de análisis genético que permite detectar variaciones en el número de copias (CNVs), o microdeleciones/microduplicaciones que no son detectables por análisis cromosómicos rutinarios, y desde su desarrollo múltiples estudios han demostrado que la tasa de diagnóstico prenatal puede incrementarse hasta en un seis por ciento si se añade al resto de técnicas mencionadas. Esta información nos conduce a la conclusión de que, aun sumando el rendimiento diagnóstico de todas estas, más de la mitad de las familias afectadas con un embarazo que presente anomalías ecográficas no obtienen un diagnóstico genético con las técnicas habituales usadas en la práctica clínica, ya que las pruebas tradicionales no pueden detectar mutaciones puntuales y pequeños indels, que son una importante causa de los trastornos monogénicos no diagnosticados (Chitty et al., 2016). Es por ello que es muy importante investigar las técnicas de secuenciación del ADN, abriendo la posibilidad de detectar una mutación con una resolución de un solo par de bases. La primera técnica de este tipo que se desarrolló fue la secuenciación de Sanger, hace treinta años, pero recientemente ha aparecido la secuenciación de nueva generación (NGS), dividiéndose en la WES y en la WGS, y reportándose el primer caso de uso clínico de NGS para la identificación de la causa genética de una enfermedad rara en el año 2010, y publicándose el primer caso descrito en el año 2012, con la

identificación de la causa genética del síndrome CHARGE (Talkowski et al., 2012).

5.2. –TÉCNICA DE WES PRENATAL

La secuenciación del exoma completo es una técnica de diagnóstico genético novedosa que ha pasado de ser raramente utilizada por su desmesurado coste económico y la dificultad de la interpretación de sus resultados, a aproximarse cada vez más a la práctica clínica en numerosos ámbitos de la medicina. Este rápido desarrollo viene de la mano con la potente evolución tecnológica e informática que experimentamos en la actualidad, permitiendo que la WES sea cada vez más rentable y que aporte una interesante y creciente utilidad clínica. Enfermedades que no hallaban un diagnóstico genético, nuevas variantes patológicas relacionadas con enfermedades como el cáncer o procesos fisiopatológicos desconocidos hasta ahora se han conseguido clarificar gracias a los recientes resultados aportados por la WES (Prokop et al., 2018).

Esta prueba genética cuenta con diferentes modalidades técnicas, y dependiendo del ámbito en que la apliquemos, podemos realizar un estudio del exoma dirigido (seleccionamos un gen o un panel de genes que nos interesen especialmente) o un estudio del exoma completo (secuenciamos la totalidad de los exomas: unos 22.000 genes). El exoma dirigido suele ser más útil en la práctica clínica, ya que, con un menor coste, permite diagnosticar de forma más específica y sencilla el trastorno que estamos buscando, y aporta una menor cantidad de hallazgos de significado incierto y hallazgos incidentales o secundarios. Estos paneles dirigidos permiten analizar genes específicos que se relacionan con ciertos fenotipos definidos. Los mejores ejemplos de paneles genéticos prenatales pueden ser el de los genes relacionados con el síndrome de Noonan o el panel de genes relacionados con la displasia esquelética (Veyver & Eng, 2015). Existe también la secuenciación del genoma completo (WGS), en la que se secuencia la totalidad del genoma del individuo, incluyendo intrones y regiones no codificantes, aunque la profundidad de su lectura disminuye, su coste se incrementa y la interpretación de sus resultados es todavía costosa. En la técnica WES, una vez extraído el ADN fetal, este se fragmenta en muchos millones de porciones, conformándose una biblioteca genómica y enriqueciéndose con secuencias de exones mediante sondas de hibridación dirigidas. La importancia de esta secuenciación radica en detectar las diferencias entre la lectura del ADN del paciente y la del genoma de referencia, y comúnmente para esto se usa la plataforma HiSeq (Illumina, San Diego, CA, EEUU), (Hillman et al., 2015).

La utilidad clínica de WES en el ámbito pediátrico y en los adultos está demostrada gracias a estudios en grandes series clínicas (rendimiento entre 22-26 por ciento), y sabemos que es útil para identificar la causa genética de una patología tras obtener

resultados negativos de las pruebas genéticas previas (cariotipo, microarrays), (Yates et al., 2017). Los primeros informes que publicó el Laboratorio del Genoma Humano (WGL) de Baylor hablaban de un aumento del veinticinco por ciento del rendimiento diagnóstico del WES en población pediátrica y adulta tras un resultado negativo del resto de pruebas. En otros dos mil casos (ochenta y ocho por ciento pediátricos) estudiados posteriormente, se confirmó ese rendimiento en torno al veinticinco por ciento del uso de WES (Veyver & Eng, 2015).

En este trabajo hemos decidido centrarnos en el estudio de la técnica de WES en el ámbito del diagnóstico prenatal, ya que se trata de una práctica muy novedosa, y sobre la que, a diferencia de la WES postnatal, aún no existen muchos estudios ni evidencias claras. El debate que planteamos en este trabajo sobre si debe o no introducirse esta técnica prenatal de diagnóstico genético de forma rutinaria en la práctica clínica se debe a que, a pesar de que cuenta con una gran potencia y numerosas ventajas, también está asociada a importantes limitaciones que deben sopesarse. Entre ellas nombramos algunas de las que el Dr. Jan Friedman mencionó (Chitty et al., 2016) en el debate oral presentado en la 19ª Conferencia Internacional sobre Diagnóstico y Terapia Prenatal (Washington DC, EEUU, 14 de Julio de 2015), en el que señaló que la WES es una prueba que no puede detectar desequilibrios, reordenamientos cromosómicos estructurales o mutaciones de la secuencia que impliquen más de unos pocos nucleótidos, que el tiempo de obtención de resultados suele ser demasiado elevado, mencionó el gran coste económico que supone, y dijo que la interpretación de los resultados es muy complicada, porque el fenotipo fetal está limitado a los hallazgos que pueden verse en la ecografía y no existen bases de datos completas sobre las correlaciones fenotipo-genotipo de cada enfermedad, como ocurre en la época postnatal. Además, la técnica WES aporta mucha información colateral que hay que procesar (hallazgos secundarios, variantes de significación incierta, datos de consanguinidad, de paternidad, etc.), y hay una falta de directrices claras que guíen al profesional en la toma de decisiones sobre qué hacer con esa información y hasta qué punto esta debe transmitirse al paciente.

En este mismo debate (Chitty et al., 2016), la doctora Lyn Chitty argumenta que la WES supera la resolución de todas las pruebas genéticas que existen en el diagnóstico genético prenatal tradicional y que tendrá una utilidad clínica significativa, ya que el obtener los resultados del WES permitirá saber, si se halla la variante patogénica, el tipo de herencia y el riesgo de recurrencia en futuros embarazos, y también, al conocer datos sobre la probable patología que sufre el feto, puede abrirse la posibilidad de un tratamiento precoz prenatal intrauterino, o bien un manejo más rápido y eficaz de la enfermedad tras el nacimiento. Sostuvo que en ese mismo año (2015) era ya posible

obtener resultados en poco más de dos semanas, y que este tiempo se iría acortando a medida que la tecnología fuera mejorándose. Además, señaló que, aunque el coste económico del WES en tríos prenatal fuera elevado, había que compararlo con el coste que suponía la odisea de pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas que debe realizarse a un recién nacido afectado de una anomalía genética desconocida, junto con el coste de la prolongada estancia hospitalaria que el paciente requeriría hasta hallar una solución. Señaló que con el avance de la tecnología 3D y 4D el fenotipo visible durante el embarazo por ecografía no distará tanto del que se observa en el periodo neonatal, y que el problema de obtener hallazgos incidentales no era una novedad, ya que estos habían sido hallados durante años con las técnicas de diagnóstico genético tradicionales, y que lo que se debe intentar era limitar la incertidumbre que generan, usando paneles específicos de genes o interpretando los resultados de forma selectiva. Para esto dijo que era imprescindible establecer un correcto asesoramiento genético previo a los padres y un consentimiento informado antes de someterse a la WES prenatal.

5.3.- ALGUNAS RECOMENDACIONES DEL AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (ACMG):

Las limitaciones que todavía existen en el uso de WES prenatal hacen que ni el ACMG ni el American College of Obstetrics and Gynecology recomienden por ahora el uso de WES de forma rutinaria, ya que estas cuestiones se deben abordar en ensayos clínicos más amplios que los que existen actualmente, en donde se valore la verdadera utilidad diagnóstica del WES (Vora et al., 2017).

El ACMG recomienda realizar un test genético dirigido antes del WES cuando tengamos una sospecha de un síndrome concreto y conocido. Además, el ACMG recomienda informar de los hallazgos secundarios para condiciones que sean potencialmente modificables médicamente, señalando un total de cincuenta y nueve genes que deberían notificarse. En el caso de variantes benignas, el ACMG recomienda no notificarlas. También aboga por un asesoramiento genético previo especializado, en el que se debe recalcar que los resultados podrían hallar una variante que explicara el fenotipo fetal, no hallar ninguna alteración que explique el fenotipo, una variante de significación desconocida (VOUS), un hallazgo secundario o incidental, y una falsa paternidad o consanguineidad, y que el paciente debe firmar un consentimiento informado en el que puede elegir qué información recibir y cuál no. Además, debe informarse de que las bases de datos y el estudio de las variantes patogénicas está en continua evolución, y que una variante que en el momento de la prueba fuera un VOUS, puede resultar patogénica en un futuro (Jelin & Vora, 2018).

5.4.- OBJETIVOS:

El objetivo general de este trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica actualizada y amplia sobre diagnóstico genético prenatal basado en la secuenciación del exoma completo. Trataremos de analizar si la técnica de WES presenta una eficacia comparable a otros métodos diagnósticos, como son el análisis de cariotipo, la hibridación fluorescente in situ (FISH) y la hibridación genómica comparativa basada en array (aCGH). Al mismo tiempo valoraremos, en los artículos encontrados de diferentes autores, cuáles son los factores que contribuyen a aumentar o a disminuir el rendimiento diagnóstico de la prueba. Por último, señalaremos los beneficios, las limitaciones y los retos que supondría la introducción de esta prueba en la práctica clínica. Además, nuestro objetivo final es aportar información reciente sobre uso de la WES prenatal en el C.H.U.B.

6.- METODOLOGÍA:

Para la realización de esta revisión bibliográfica hemos utilizado como página web de búsqueda principal PubMed, y también hemos buscado información complementaria en otras páginas webs y en artículos de revistas científicas o libros, para así poder completar nuestro trabajo. Por otra parte, la información de los casos estudiados mediante WES prenatal en el CHUB ha sido recogida desde la Unidad de Genética clínica del Servicio de Pediatría del HUB, tratando esta información de forma estrictamente anónima en todas las referencias que hacemos.

7.- RESULTADOS:

7.1.-EFICACIA DE LA WES PRENATAL SEGÚN LOS ESTUDIOS REVISADOS:

En el año 2014 (Carss et al., 2014) se realizó un estudio sobre una cohorte de treinta fetos y neonatos no aneuploides, utilizando la técnica de WES prenatal y analizando el ADN de los fetos junto al de sus padres no consanguíneos. Numerosos estudios que iremos mencionando abogan por este análisis en “tríos” frente al análisis de solo probando (solo ADN fetal), ya que se asocia a un mayor rendimiento diagnóstico y a la obtención de una información más precisa sobre la herencia de la variante patogénica. La mediana de la edad gestacional en la confirmación del diagnóstico para los fetos de

esta cohorte fue de veintiún semanas. Como resultado se obtuvo la identificación de treinta y cinco variantes de novo de un solo nucleótido (SNV), pequeños indels, deleciones o duplicaciones, y de estas el diez por ciento (es decir, tres de ellas) tenían altas probabilidades de ser causantes de la patología fetal. Estas tres variantes de novo fueron halladas en los genes FGFR3, COL2A1 y una deleción de novo en la mayor parte de OFD1. Por otra parte, se descubrieron también en cinco de los casos (diecisiete por ciento) variantes recesivas o ligadas al cromosoma X de novo o heredadas, las cuales eran posiblemente causales de la patología fetal, pero requerían de estudios adicionales para confirmarlo.

En otro estudio (Ellard et al., 2015) se pretendió realizar un diagnóstico genético de trastornos letales autosómicos recesivos en fetos hijos de parejas no consanguíneas. Para ello se analizó el exoma completo de ocho parejas no emparentadas para determinar en cuántos genes se detectarían variantes heterocigotas potencialmente deletéreas en ambos miembros de la pareja. Una de las familias tenía antecedentes de cinco embarazos previos afectados con un fenotipo fetal similar, y mediante la secuenciación de los exomas de la pareja se identificaron variantes heterocigotas raras y potencialmente deletéreas en ambos miembros de la pareja para dos genes; NR1D1 y DYNC2H1. También se investigaron dos familias con historial de múltiples fetos cuyo embarazo fue interrumpido por un diagnóstico ecográfico prenatal de síndrome de acinesia fetal. En la primera pareja se encontraron variantes heterocigotas raras en dos genes, CLIP1 y GLE1, y se confirmó que ambas estaban presentes en los dos fetos afectados, siendo la heterocigosidad compuesta para estas variantes conocidas de GLE1 la causa del síndrome de acinesia fetal en esta familia. La segunda pareja tuvo una hija sana y después tres fetos con artrogriposis. Se identificaron cuatro genes en los que ambos padres eran heterocigotos para variantes raras con posibles consecuencias patogénicas, entre ellos destacamos variantes heterocigotas en el gen RYR1. Los tres fetos afectados eran heterocigotos compuestos y la hija no afectada no había heredado ninguna de las dos variantes, y se concluyó que era muy probable que estas variantes de RYR1 fueran la causa de la acinesia fetal, la artrogriposis y la hipoplasia pulmonar que presentaron los tres fetos. Se concluye en este estudio que el uso de WES para estudiar parejas no consanguíneas es útil para diagnosticar posibles trastornos fetales de HAR. Un diagnóstico genético de este tipo confirma el riesgo para la futura descendencia y permite el diagnóstico prenatal temprano o el diagnóstico genético preimplantacional en futuros embarazos.

En el estudio de Alamillo et al. (2015) se muestra un análisis retrospectivo de siete casos

en los que se realizó la técnica de WES prenatal tras la muerte del feto o la interrupción del embarazo. Todos ellos presentaban anomalías congénitas en los estudios ecográficos, y el estudio se realizó en tríos. Se incluyeron siete fetos que fueron remitidos entre los años 2012 y 2014 con anomalías detectadas en la ecografía prenatal, y los resultados se obtuvieron en un plazo medio de 23,8 semanas. Todos los casos que incluyeron contaban con un análisis de cariotipo normal, y los resultados de los microarrays cromosómicos estaban disponibles en cinco de los siete casos, y eran normales o inciertos. La WES halló alteraciones relevantes en 4/7 casos (rendimiento de un cincuenta y siete por ciento); el primer hallazgo fue una alteración en el gen COL1A2 en un feto masculino con displasia esquelética de etiología desconocida, se trataba de una variante patogénica de novo heredada de forma autosómica dominante, que provocó una osteogénesis imperfecta tipo II. El segundo hallazgo consistió en dos alteraciones en el gen GBE1 heredadas de forma autosómica recesiva, resultando diagnósticas de una enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo IV. El tercer feto presentaba onfalocelo, labio leporino y paladar hendido bilateral, y se diagnosticó una alteración en el gen OFD1 heredada de forma recesiva y ligada al cromosoma X, causante del síndrome digital-oral-facial tipo 1. El último de ellos presentaba un fenotipo de artrogriposis, y tenía una alteración patogénica en el gen RAPSN heredada de forma autosómica recesiva, provocando un síndrome de acinesia fetal. A pesar de los hallazgos encontrados, se menciona que la cohorte estudiada es muy pequeña y que se requerían estudios a mayor escala y menos sesgados para poder sacar conclusiones.

Un nuevo estudio (Drury et al., 2015) fue realizado sobre una cohorte de veinticuatro fetos con hallazgos ecográficos anómalos, en el que se realizó la WES prenatal con ADN fetal extraído mediante pruebas invasivas. En catorce de ellos solo se realizó WES a los fetos, y en los diez restantes se hizo el análisis en tríos. En el veintiún por ciento de los casos (5/24) la WES obtuvo un diagnóstico definitivo, siendo estos casos de la enfermedad de Milroy (mutación heterocigota autosómica dominante del gen FLT4), hipofosfatasa (mutación de parada aparentemente homocigota en el gen que codifica la fosfatasa alcalina, ALPL), acondrogénesis tipo 2 (mutación en el gen COL2A1), síndrome de Freeman-Sheldon (mutación autosómica dominante en el gen MYH3) y síndrome de Baraitser-Winter (mutación de novo en el gen ACTB). En 2/24 casos se identificó una única mutación en un gen autosómico recesivo (ocho por ciento), pero no se pudo confirmar el diagnóstico por falta de cobertura de la secuenciación. La cohorte que se estudió con un análisis exclusivamente fetal (14/24 fetos) tuvo un rendimiento diagnóstico de un catorce por ciento (2/14), mientras que la cohorte en la que se aplicó el análisis en trío logró una tasa de diagnóstico de un treinta por ciento (3/10), por lo que

en este estudio apoyan la realización de la WES prenatal en tríos frente al análisis de solo probando. Además de los diagnósticos definitivos ya mencionados, también se encontró en uno de los fetos un diagnóstico probable por una mutación en el gen OFD6, pero se necesitaba seguirlo durante más tiempo para poder confirmarlo como variante patogénica. Señalan en este estudio algunas limitaciones de la WES prenatal, que requiere aumentar su cobertura y disminuir el tiempo de obtención de resultados. También admiten que este estudio cuenta con una cohorte pequeña, y que se requerían estudios más amplios sobre el tema. Podemos mencionar por último la obtención de dos hallazgos incidentales no relacionados con el fenotipo fetal en esta cohorte; uno fue un caso de NF1 y otro un caso de enfermedad de Wilson, que fueron correctamente informados.

En el año 2016 incluimos un único estudio (Pangalos et al., 2016) en el que se usó la técnica de WES prenatal mediante una priorización de variantes según el algoritmo Fetalis, centrándose en 758 genes que se pudieron correlacionar con los fenotipos y anomalías ecográficas observadas en los fetos de la cohorte. Este análisis se realizó sobre catorce fetos euploides (once embarazos y tres abortos). La tasa de diagnóstico fue de 6/14, es decir, de un cuarenta y tres por ciento. Las anomalías ecográficas fetales tienen una gran heterogeneidad genética y fenotípica, y aunque existan fenotipos similares, como pueden ser malformaciones o displasias esqueléticas, estas a su vez pueden asociarse a una gran variedad de alteraciones genéticas. El panel con los 758 genes seleccionados en este estudio fue creado por profesionales en medicina fetal y genética, y se hizo recopilando cuidadosamente información procedente de múltiples fuentes y utilizando la terminología y la base de datos de la Ontología del Fenotipo Humano y los datos de Phenomizer. Al interpretar los resultados en este estudio consideraron las mutaciones patogénicas ya conocidas y las variantes patogénicas obligatorias (tipo nonsense, frameshift, indels, variantes de sitio de empalme canónico...). Los investigadores informaron a los pacientes antes de firmar el consentimiento informado de que las pruebas no revelarían hallazgos incidentales, y los resultados estuvieron disponibles en diez días. En la cohorte de abortos el primer caso era sobre una mujer de veinticuatro años con una interrupción del embarazo a la semana veintisiete de gestación. El feto presentaba en la ecografía anomalías bilaterales de las extremidades y pies equinovarus. Se descubrieron dos variantes heterocigotas missense en el gen EVC2, de HAR, que causaron el síndrome de Ellis-van Creveld. El segundo caso fue un feto con contracturas articulares, hidrocefalia leve y disminución de los movimientos fetales, y se diagnosticaron dos variantes sin sentido en el gen NEB asociadas a la miopatía Nemaline 2, de herencia autosómica recesiva. El tercer caso

fue sobre un feto con antebrazo derecho hipoplásico, defectos en la muñeca y en las falanges de la mano derecha, descubriéndose la presencia heterocigótica de una mutación sin sentido del gen COL3A1, asociada al síndrome de Ehlers-Danlos IV, que es un trastorno de HAD con expresividad variable.

En la cohorte de los embarazos en curso, el primer caso fue un feto con una TN elevada (TN=4,8 mm) y un higroma quístico. Se halló una mutación heterocigótica de novo en el gen PTPN11, asociada al trastorno genético de HAD conocido como Síndrome de Noonan tipo 1. El segundo caso presentaba un feto con malformación de Dandy-Walker y dilatación ventricular, viéndose que era heterocigoto compuesto para las variantes del gen ASS1. Esta alteración no había sido reportada ni descrita previamente, y fue considerada como probablemente patogénica, ya que las alteraciones del gen ASS1 se asocian a la citrulinemia autosómica recesiva. El tercer caso era sobre un feto con un defecto cardíaco septal ventricular, y se encontró una mutación patogénica heterocigótica en PROKR2, que podía estar asociada al síndrome de Kallmann. El cuarto feto presentaba una rotación del vermis cerebeloso y un agrandamiento de la cisterna magna, teniendo una mutación de sentido erróneo heterocigota en el gen ZIC1, asociada a la malformación de Dandy-Walker. Los siete casos restantes no presentaron variantes patogénicas según las pruebas de Fetalis, en todos ellos se decidió continuar con el embarazo, y en el momento del estudio son todos recién nacidos sanos que no han tenido problemas en los primeros 3-5 meses de vida. El WES prenatal dirigido a los 758 genes seleccionados hizo que el diagnóstico fuera más rápido y rentable que el análisis completo mediante WES, además de evitar VOUS.

Revisamos ahora otro estudio (Yadava & Ashkinadze, 2017) cuyo objetivo era comprobar que el uso de WES prenatal en casos especialmente seleccionados lograba incrementar el rendimiento diagnóstico de la prueba, que sin selección se estimaba entre un 21-43 por ciento. En él se incluyeron los cinco primeros fetos en los que se realizó WES prenatal atendidos en la Escuela de Medicina Robert Wood Johnson de Rutgers. Los criterios de selección para esta cohorte fueron explicados por las autoras en un artículo posterior (Yadava & Ashkinadze, 2019), y se resumen en: la consanguinidad de los padres (dos de las parejas eran primos hermanos), el poseer grandes regiones de homocigosidad en el microarray (uno de los fetos la presentaba) y la alta probabilidad de tener un trastorno de un solo gen (dos de los fetos las tenían). El diagnóstico molecular mediante WES fue exitoso en cuatro de los cinco fetos estudiados (rendimiento del ochenta por ciento); los diagnósticos encontrados fueron una mutación de novo que provocó una microoftalmia tipo 3, una mutación de novo en COL1A2 que provocó una osteogénesis imperfecta tipo 2, una mutación homocigótica en RASPN que

provocó un síndrome de acinesia fetal y una mutación homocigótica en el gen TCTN3 que provocó un síndrome oro facial digital tipo 4. A pesar de que la cohorte de este estudio fue pequeña, los resultados pueden ser indicativos de que el hecho de introducir criterios de selección aumenta significativamente la capacidad diagnóstica de WES prenatal.

En otro estudio (Yates et al., 2017) se realizó la WES prenatal a un conjunto de ochenta y cuatro fetos fallecidos, siendo la cohorte descrita más amplia hasta ese momento. En los resultados de la WES el veinte por ciento de los casos resultaron positivos, el cuarenta y cinco por ciento obtuvieron hallazgos posiblemente relacionados, el nueve por ciento tenían solo variantes de genes candidatos y el veintiséis por ciento resultaron negativos. Las anomalías ecográficas visualizadas más frecuentes fueron las del SNC (treinta y siete por ciento), hidropesía/edema (treinta y seis por ciento) y las cardiovasculares (treinta y un por ciento), y todas ellas fueron visualizadas por ecografía, examen post mortem o autopsia. Los fenotipos y diagnósticos diferenciales propuestos por los profesionales médicos del estudio fueron incluidos en términos de la Ontología de Fenotipos Humanos, la Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas y la Base de Datos de Herencia Mendeliana en el Hombre, y sirvieron para la realización de WES. La técnica de WES fue practicada en fetos únicos en un treinta y cuatro por ciento de los casos, en dúo materno-fetal en un cinco por ciento de los casos, en tríos en un cincuenta y cuatro por ciento de los casos, y un siete por ciento fueron muestras de padres y hermanos. El mayor rendimiento diagnóstico de la WES tanto prenatal como postnatal al realizarse la prueba en tríos en lugar de en un feto único fue corroborado por los resultados de este estudio (veinticuatro por ciento en tríos frente a catorce por ciento en feto único). Un treinta y dos por ciento de las parejas tenía embarazos previos afectados, y en un ochenta y nueve por ciento de ellos el fenotipo fetal era similar. En el ochenta por ciento de los casos se realizó previamente un análisis de cariotipo y/o microarray, siendo todos los resultados normales excepto en dos casos con microdeleciones no diagnósticas de herencia paterna. El sesenta y dos por ciento de los casos presentaban múltiples anomalías congénitas, y el resto tenía una anomalía aislada. El rendimiento en ambos casos fue similar (veinte por ciento frente a veintiún por ciento). En otros estudios estos resultados varían (las anomalías multisistémicas tienden a aumentar el rendimiento diagnóstico de la prueba), al igual que el lugar o el tipo de afectación ecográfica más frecuente. En los casos positivos de WES, se vio que el cuarenta y un por ciento tenían una variante con HAD, el veinticuatro por ciento tenían HAR, el veintinueve por ciento tenían herencia ligada al cromosoma X, y un seis por ciento tenía una variante que podía ser tanto dominante como recesiva.

Este mismo año se publicó otro estudio (Fu, 2017) sobre una cohorte de 3949 embarazos afectados por anomalías ecográficas fetales. En él se practicaron de forma secuencial las diferentes técnicas de diagnóstico genético rutinarias; el cariotipo convencional (rendimiento del 18,2 por ciento) y el análisis de microarrays cromosómicos (rendimiento del 8,2 por ciento), y, por último, se añadió la WES prenatal, que logró un diagnóstico definitivo en 47 casos de los 196 fetos que se estudiaron por esta técnica, es decir, en un veinticuatro por ciento de ellos. Los resultados de este estudio vuelven a señalar la mayor tasa diagnóstica del estudio de WES por tríos que en la de solo probando (rendimiento del 26,5 por ciento frente a un 23,1 por ciento). La tasa de VOUS fue de un 12,8 por ciento, y contaron con un 6,1 por ciento de hallazgos incidentales. En este estudio se excluyeron aquellos fetos que presentaran marcadores ecográficos aislados (quistes en el plexo coroideo, focos ecogénicos en el intestino o el corazón, ausencia del hueso nasal, grosor de la TL > 3,5 mm, etc), mientras que los fetos seleccionados presentaron malformaciones que incluyeron el SNC, el sistema cardiovascular, el esquelético, el digestivo y el urinario. Para determinar la patogenicidad de las variantes encontradas por WES se usaron bases de datos como OMIM, ClinVar y Human Gene Mutation Database, y estas variantes se seleccionaron inicialmente según la profundidad de secuenciación, la frecuencia de mutación, el MAF (frecuencia del alelo menos común), las variantes localizadas en regiones codificantes o en una unión exón-intrón, las predicciones de proteínas deletéreas o de empalme y las variantes en un gen responsable de una enfermedad o un fenotipo recogido en OMIM. Tras este análisis inicial se seleccionaron también según el tipo de herencia. Finalmente, los profesionales las clasificaron como patogénicas, probablemente patogénicas, VOUS, benignas o probablemente benignas. En el estudio del WES se hallaron inicialmente 817 posibles variantes de un solo nucleótido (SNV) y pequeños indels (sesenta y cuatro en el grupo de tríos y 753 en el de probandos). Tras esto se validaron noventa y cinco variantes como variantes con potencial significación clínica (cincuenta y dos en el grupo de tríos y cuarenta y tres en el de solo probando). Estas variantes se distribuyeron en cincuenta y nueve muestras fetales, dando una tasa de diagnóstico global de un 30,1 por ciento, aunque doce de ellos se clasificaron finalmente como hallazgos incidentales por no poderse relacionar con los fenotipos observados, por lo que la tasa de diagnóstico definitivo quedó en un veinticuatro por ciento. Destacamos la menor tasa de diagnóstico que obtuvo el subgrupo de fetos con una sola malformación (22,3 por ciento) con respecto a los fetos con anomalías múltiples (30,8 por ciento). En cuanto a la tasa diagnóstica según el tipo de malformación, la mayor fue la del sistema esquelético (30,8 por ciento), seguida del sistema urogenital (23,1 por ciento), los rasgos

faciales dismórficos (23,4 por ciento), el SNC (23,1 por ciento), el sistema CV (20,6 por ciento) y el sistema digestivo (0 por ciento). Un 78,95 de las noventa y cinco variantes eran mutaciones de novo y tenían una HAD. La conclusión del estudio fue que el rendimiento diagnóstico del WES prenatal (veinticuatro por ciento) fue superior al del cariotipo convencional (18,2 por ciento) y al CMA (8,2 por ciento) en esta muestra. También se admitieron las limitaciones del estudio, que fue retrospectivo y podría estar parcialmente sesgado.

El estudio de Vora et al. (2017) se realizó sobre una cohorte de quince fetos anómalos en tríos. En 7/15 fetos (cuarenta y siete por ciento) el uso de WES tras un resultado negativo en el cariotipo y en el arrays proporcionó un diagnóstico genético. En este estudio se seleccionaron tríos, y se incluyeron fetos con múltiples anomalías congénitas y un patrón sugestivo de un trastorno genético subyacente. Señalaron la importancia de proporcionar un adecuado asesoramiento genético a los padres previo a la realización del WES. En este estudio se usaron listas de genes para realizar un WES dirigido, en donde se presentaron todos los genes y variantes que creyeron que podían tener una asociación con el fenotipo fetal. En el caso de que no encontraran ninguna variante de esta lista, pasaron a analizar manualmente todas las variantes de HAR y de HAD para determinar su posible función en relación con el fenotipo fetal, y usaron fuentes como la base de datos Online Mendelian inheritance in Man o el Exome Aggregation Consortium. Las muestras de los padres se analizaron según las directrices del ACMG, seleccionando un pequeño subconjunto de genes que son médicamente procesables (como el BRCA), y que por tanto pueden ser también informados, y hallándose en este estudio concreto un caso de hipercolesterolemia familiar (gen LDLR) en uno de los padres, que fue correctamente informado sobre ello. En este estudio se incluyó como novedad una evaluación de la comprensión de conocimientos genéticos de las madres por un asistente de investigación capacitado, y reveló una mediana elevada sobre las expectativas de que el WES proporcionara resultados para las anomalías fetales. También aportaron otro hallazgo estadísticamente significativo, que consistió en que las mujeres con nivel socioeconómico más elevado se relacionaban con unos conocimientos genómicos mayores previos a la secuenciación. Por otra parte, describieron un hallazgo que apoyó el valor de la WES para revelar nuevos genes candidatos para trastornos del desarrollo: un feto que presentaba un defecto cardíaco complejo y una localización renal anormal presentaba una mutación de novo en el gen MAP4K4, variante que se ha demostrado letal en modelos de ratón knockout, pero de la que todavía no se ha descrito un fenotipo en humanos. Este hallazgo convierte a este gen en un potente candidato para ser causa de un trastorno del desarrollo humano. El

rendimiento elevado del estudio puede estar influido por los criterios de inclusión establecidos, ya que se seleccionaron fetos con alta probabilidad de tener una etiología genética, con anomalías ecográficas múltiples y en embarazos no continuados, y además se realizó un estudio en tríos. También se usaron en este estudio listas de genes específicos del fenotipo fetal para optimizar el tiempo de respuesta del WES, contaron con programas bioinformáticos y con un equipo multidisciplinar de genética para clasificar los resultados adecuadamente.

Stals et al. (2018) habla en su estudio de una serie de cincuenta parejas que tenían uno o más embarazos afectados por anomalías fetales prenatales y fueron analizadas por WES prenatal. Mencionamos que veintinueve de las cincuenta parejas habían tenido dos o más embarazos afectados y había consanguineidad en 11 de las parejas que estudiaron. Los investigadores crearon una lista de variantes patogénicas candidatas en diferentes genes, y se revisaron con la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), comparándolas con el fenotipo fetal observado. En este estudio la WES prenatal halló variantes patogénicas o probablemente patogénicas heterocigotas en ambos miembros de la pareja en 26/50 parejas (cincuenta y dos por ciento), y en las veintinueve parejas que tenían dos o más fetos afectados, el rendimiento fue de 18/29 (sesenta y dos por ciento), en comparación con el rendimiento en las parejas con un solo embarazo afectado, que fue 8/21 (treinta y ocho por ciento). En los veinticuatro casos restantes no se identificaron variantes patogénicas. En veinticinco casos la herencia fue autosómica recesiva y en una familia se identificó una herencia recesiva ligada al X. Señalamos que el rendimiento diagnóstico en las parejas consanguíneas fue de 6/11 (cincuenta y cuatro por ciento). Los investigadores encontraron un hallazgo incidental en una de las parejas consanguíneas, que era portadora heterocigota de una variante patogénica de cambio de marco en el gen GNPTAB, causante de Mucopolisidosis II alfa/beta, y lo informaron a los pacientes debido a su relevancia clínica. En algunos fetos de este estudio se pudo realizar un diagnóstico prenatal que normalmente no se identificaría en esta época (en una familia identificaron el síndrome de Peters-plus tras hallar una mutación fundadora en el gen B3GLCT, un diagnóstico que suele realizarse postnatalmente, siendo la hidrocefalia severa la única pista que tuvieron para conseguir el diagnóstico precoz). También lograron ampliar la correlación fenotipo-genotipo en algunos casos, como en una familia en la que detectaron una variante de sentido erróneo en el gen LRP4, que es causa conocida del síndrome de Cenani-Lenz y se caracteriza por un fenotipo menos grave que el observado en el caso fetal (anomalías renales y sindactilia/polidactilia), pero comprobaron que algunas variantes de sentido erróneo pueden tener este impacto grave en la función de la proteína afectada y

provocar este fenotipo prenatal letal o muy grave. En tres de las familias usaron un exoma clínico dirigido, llegando a un diagnóstico en 2/3 familias. Las causas mencionadas por las que creen que no lograron realizar diagnósticos en las veinticuatro familias restantes incluyeron patrones de herencia diferentes, casos de mosaicismo gonadal, trastornos no monogénicos, variantes patogénicas no codificantes, variantes patogénicas estructurales, genes patógenos no asociados aún a fenotipos fetales, mala cobertura de los genes causantes o la posibilidad de haber filtrado las variantes patogénicas mediante la estrategia bioinformática utilizada.

En el estudio de Chandler et al. (2018) se usó la WES prenatal en tríos para el diagnóstico de una serie de fetos que presentaron anomalías ecográficas sugestivas de displasia esquelética. Existe un panel virtual de 240 genes seleccionados que pueden provocar algún tipo de displasia esquelética, y los investigadores lo usaron para la interpretación de los resultados. Con esta selección de casos y la técnica de secuenciación dirigida lograron llegar a un diagnóstico definitivo en 13/16 casos (rendimiento del ochenta por ciento). El estudio del que hablamos se hizo de manera prospectiva, y los criterios de inclusión que usaron fueron fetos que presentaran huesos largos cortos con o sin evidencia de arqueo o fractura de huesos, hipomineralización, hidropesía o hipoplasia torácica. De los dieciséis fetos que secuenciaron hallaron un diagnóstico en trece, y de los tres que no obtuvieron diagnóstico uno de ellos presentaba una variante de herencia paterna en COL1A1, y viendo que el padre era de estatura normal, sin signos de OI ni antecedentes de fracturas, se clasificó como VOUS y no se notificó. Tras el nacimiento se vio que el niño tenía los huesos largos normales con un leve arqueo en los fémures detectado por radiografía. Otro de ellos presentaba una variante heterocigota en GDF5 con herencia materna, y viendo que su madre no presentaba ninguna clínica se clasificó también como VOUS; el bebé nació a las veintinueve semanas de gestación por una insuficiencia placentaria, y actualmente tiene tres meses de edad y se desarrolla con normalidad. En el tercero los investigadores no encontraron variantes usando el panel de genes seleccionados, pero viendo los hallazgos ecográficos, estos eran sugestivos de una craneosinostosis, por lo que incluyeron ocho genes al panel que se pueden asociar a esta, y también 123 genes que se asocian a ciliopatías; de esta forma identificaron una variante en RECQL4, causante del síndrome de Baller-Gerold, pero como no se identificó una segunda variante patogénica no pudo confirmarse el diagnóstico, y la gestación terminó en muerte intrauterina. En el resto de casos el diagnóstico fue hallado mediante WES. Los plazos de obtención de resultados en este estudio oscilaron entre once y cuarenta y un días, con el tiempo se fueron optimizando y finalmente el máximo plazo fue de dos semanas.

Hubo un caso en el que el resultado de WES permitió a los padres tomar la decisión de continuar con el embarazo: el feto presentó en la ecografía de la semana veinte un acortamiento significativo de todos los huesos largos y un tórax pequeño con osificación normal, sin fracturas ni arqueamientos. Un hijo anterior de la pareja había nacido con estatura baja, y los padres no sabían si estaba relacionado con ello o se trataba de una displasia esquelética grave de novo. Haciendo una secuenciación a los padres y al primer hijo, pudo detectarse una inserción homocigótica de desplazamiento de marco en OBSL1, que era heterocigótica en los padres. La secuenciación en las muestras fetales confirmó que este era homocigoto para esta variante al igual que su hermano, y gracias a ello, los padres decidieron continuar con el embarazo. Las variantes que encontraron fueron de novo en seis de los casos, y de HAR en cuatro de ellos.

Por otra parte, el estudio de Daum et al., (2019) recogió una cohorte de 77 muestras fetales incluidas entre los años 2012 y 2017 a las que se les realizó la WES prenatal. En este estudio un veintisiete por ciento de los casos fueron introducidos por malformaciones múltiples, un diecinueve por ciento por una malformación cerebral aislada y un dieciséis por ciento por un aumento aislado de la TN. Los resultados fueron que el WES prenatal no fue diagnóstico en ninguno de los casos remitidos por una TN aumentada aislada, y en el resto de casos lograron un diagnóstico genético en un veinticinco por ciento de los casos (16/65, excluyendo los casos de TN aislada). Analizaron el rendimiento diagnóstico de la prueba en función de la existencia de consanguineidad, el tipo de muestra (trío o solo probando) y el criterio de inclusión. Mencionan que en este estudio existió una importante causa de sesgo, y fue que las familias no consanguíneas se remitieron mayormente para un análisis de tríos, debido a las limitaciones de tiempo en los embarazos en curso para tomar decisiones, mientras que las familias con relaciones consanguíneas solían indicarse para análisis de solo probando, ya que al tener más probabilidad de padecer trastornos fetales graves, muchos de los embarazos se habían ya interrumpido, y resultaba más económico analizar solo al probando. Este sesgo provocó que el rendimiento diagnóstico de los casos estudiados mediante WES en solo probandos fuera mayor que el de tríos (veinticinco por ciento frente a un quince por ciento), ya que la mayor parte de las familias analizadas solo con muestra de probando presentaban consanguineidad, y por lo tanto también mayor probabilidad de presentar un trastorno genético. Señalan que los resultados de las pruebas genéticas de arrays y cariotipo fueron previamente normales en todos los casos analizados. Al mostrar los resultados vemos que el rendimiento diagnóstico en las pruebas que realizaron a familias con consanguineidad fue de un cincuenta por ciento (7/14), mientras que solo un dieciséis por ciento (9/56) obtuvieron

un diagnóstico definitivo en las familias no consanguíneas. De los 77 fetos que se incluyeron en el estudio, 38/77 (cuarenta y nueve por ciento) eran embarazos en curso, llegando a un diagnóstico en 7/38 (dieciocho por ciento) de los casos. Solo se dispuso de datos sobre el resultado del embarazo en 5/7 de estos casos diagnosticados: tres llegaron a término, naciendo por cesárea electiva dos de ellos (alteraciones en genes PTEN y COL1A2) y muriendo otro en el periodo neonatal (alteración en gen BBS10). Los otros dos embarazos se interrumpieron (alteraciones en CHD7 y COL11A1). En este estudio se seleccionaron y describieron algunos de los casos diagnosticados mediante WES prenatal en esta cohorte; uno de ellos era un feto que presentó anomalías ecográficas en la semana veinticuatro como labio leporino, paladar hendido, pabellón auricular pequeño, ventriculomegalia derecha, sospecha de CIA, vena cava superior izquierda persistente y agenesia renal unilateral. La WES prenatal identificó una variante de novo sin sentido en el gen CHD7, que se correspondía con el síndrome de CHARGE. Con estos resultados informaron a los padres sobre el pronóstico en cuanto a discapacidad visual, auditiva e intelectual, y estos decidieron interrumpir el embarazo. Se les informó también de que el riesgo de recurrencia era bajo. Otro de los casos descritos trataba de una familia que había tenido un embarazo anterior con anomalías ecográficas similares a las que presentaba el feto actual, y una TN aumentada. La WES en trío y del ADN fetal del embarazo previo diagnosticó una variante patogénica sin sentido de novo en el gen SETBP1 en ambos fetos, causante del síndrome de Schinzel-Giedion. Investigaron el haplotipo y hallaron un mosaicismo de la línea germinal paterna, y la familia decidió realizar una FIV con diagnóstico genético preimplantacional y pudo concebir una hija sana. Como conclusiones en este estudio mencionaron que el aumento de la TN aislada se asociaba a un bajo rendimiento diagnóstico por WES, que recomendaban un análisis de anomalías temprano (semanas 15-17) para poder tomar decisiones reproductivas a tiempo, que se debía asesorar a la pareja previamente a la prueba e informarles del riesgo de recurrencia según el tipo de herencia, que se debía dar información pronóstica cuando se llegara a un diagnóstico genético definitivo y que se consideró que la asociación a un mayor rendimiento diagnóstico en el análisis de solo probando fue consecuencia de un sesgo existente en el presente estudio.

Quinlan-Jones et al. (2019), por su parte, llevó a cabo un estudio en el que se propuso comprobar el rendimiento de la técnica de WES prenatal combinado con la realización de autopsias de aquellos fetos o neonatos cuyas anomalías estructurales detectadas por ecografía les condujeran a la interrupción del embarazo, la muerte intrauterina o la muerte neonatal temprana. Fue realizado en una cohorte de 27 fetos, con un análisis en trío, y logró establecer un diagnóstico genético definitivo en 10/27 casos (treinta y siete

por ciento), siendo estos hallazgos útiles para dar información a los padres sobre el riesgo de recurrencia en embarazos posteriores. La autopsia les sirvió para añadir detalles al fenotipo que se había observado prenatalmente mediante ecografía, y así poder contribuir a la adecuada interpretación y correlación con los resultados genéticos de WES. En todos los casos que se incluyeron se habían dado previamente resultados normales en la QF-PCR (para la detección de aneuploidías) y en el análisis mediante Array CGH, y filtraron las variantes según su potencial importancia clínica estudiando sus consecuencias funcionales (alteración de proteínas) y la frecuencia alélica menor (MAF). Además, usaron un panel de genes virtual que incluía la lista completa de genes DDG2P, eliminando algunos de los genes por ausencia de fenotipo prenatal y añadiendo otros que se relacionan con trastornos del desarrollo según la literatura. Realizaron la autopsia siguiendo las directrices del Royal College of Pathologists, con un examen externo, una radiografía, un examen interno y examen histológico de los órganos internos afectados. Obtuvieron la información sobre los fenotipos de la combinación de hallazgos de la ecografía prenatal y la autopsia. Hicieron una primera clasificación en doce clases según el sistema anatómico afectado, y después la segunda reclasificación la realizó el patólogo perinatal según los mismos criterios, pero tras los hallazgos de la autopsia. El patólogo reclasificó cuatro de los casos gracias a la información de este último procedimiento. Las alteraciones del gen KMT2D fueron diagnósticas en dos individuos, haciendo que el síndrome de Kabuki fuera el diagnóstico más común. Señalan que el rendimiento fue mayor en aquellos padres que eran consanguíneos (cincuenta por ciento) con respecto a los que no lo eran (treinta y tres por ciento), pero no fue estadísticamente significativo. Hallaron diez VOUS que no tuvieron relevancia en relación al fenotipo fetal y no fueron informados. En general en este estudio existió una buena asociación entre el fenotipo fetal visto por ecografía y los hallazgos posteriores en la autopsia, aportando esta última la reclasificación de cuatro de los casos, pero sin conllevar esto una alteración en el diagnóstico. Comentan que estos detalles pueden contribuir a una mejor interpretación de las variantes detectadas en WES y a ampliar el conocimiento del fenotipo prenatal en los trastornos del desarrollo. Los resultados de WES fueron muy útiles para informar sobre el riesgo de recurrencia y la posibilidad de un diagnóstico preimplantacional en embarazos posteriores en aquellos trastornos heredados. Dispusieron en este estudio de un sistema de reanálisis, volviendo a analizar las muestras en cinco puntos temporales que planificaron para incluir variantes recientes. Esto los llevó a la detección de variantes patogénicas en dos casos sin diagnóstico previo, añadiéndose ambos genes al panel de genes virtual tras la revisión, y demostrando que la revisión sistemática de los datos proporciona un aumento significativo del rendimiento diagnóstico.

Vamos ahora a introducir el estudio con la cohorte más grande realizado hasta el día de hoy (Lord et al., 2019). Se trata del estudio PAGE, que incluyó una cohorte prospectiva reclutada entre los años 2014 y 2017 en treinta y cuatro unidades de medicina fetal de Inglaterra y Escocia, en las que se realizó WES prenatal tras obtener resultados normales en arrays y cariotipo a un total de 610 fetos con anomalías estructurales ecográficas y 1202 muestras fetales emparejadas (596 tríos feto-padres y catorce díadas feto-padre). Se realizó un filtrado bioinformático y se seleccionaron 321 variantes genéticas (255 diagnósticos potenciales) como probablemente patogénicas, siendo analizadas mediante WES prenatal dirigido a un panel genético de 1628 genes relacionados con trastornos del desarrollo fetal. Se encontró una variante diagnóstica en 52/610 fetos (8,5 por ciento) y una variante de significado incierto con potencial relevancia clínica en 24/610 fetos (3,9 por ciento). Obtuvieron un diagnóstico genético 22/143 (15,4 por ciento) fetos con anomalías multisistémicas, 9/81 (11,1 por ciento) de los fetos con anomalías cardíacas y 10/65 (15,4 por ciento) de los que presentaban anomalías esqueléticas. Estos fenotipos fueron los que con más frecuencia llegaron a un diagnóstico mediante WES prenatal. Se comprobó que aquellos fetos que presentaban una TN aumentada aislada hallaron un diagnóstico en 3/93 fetos (3,2 por ciento), siendo este rendimiento significativamente más bajo. En este artículo señalan que el rendimiento diagnóstico de WES en esta cohorte prospectiva con una amplia gama de anomalías estructurales fetales es inferior a la sugerida por estudios previos, en los que la cohorte solía ser pequeña e incluía subgrupos de fenotipos mucho más seleccionados. Esto es importante, ya que indica que actualmente para una correcta implementación en la práctica clínica se deben clarificar aquellos criterios de inclusión que supongan un mayor rendimiento diagnóstico mediante WES. Aclaran que en este estudio los resultados de la WES prenatal no estuvieron disponibles durante el embarazo en curso, por lo que la información que se obtuvo no sirvió a la hora de tomar decisiones sobre la gestación. Las variantes candidatas solo se comunicaron a los padres si se consideraron como causa de las anomalías que presentaban los fetos, pero sí se validaron las VOUS que el comité interdisciplinar consideró como relevantes clínicamente. En 474/610 (setenta y ocho por ciento) fetos se dispuso del resultado del embarazo: en 142 (treinta por ciento) se optó por la interrupción de este, en catorce (tres por ciento) ocurrió un aborto espontáneo, hubo veintidós (cinco por ciento) mortinatos, catorce (tres por ciento) muertes neonatales y 282 (cincuenta y nueve por ciento) nacieron vivos. Se mencionan algunas cuestiones éticas del estudio PAGE, destacando la decisión de comunicar o no aquellos hallazgos que podrían suponer un riesgo de recurrencia en un trastorno del desarrollo heredado, pero que no están relacionados con

el fenotipo fetal, aquellos VOUS que probablemente tengan relevancia clínica y la detección de variantes de HAR no relacionadas con el fenotipo fetal que podrían heredarse y manifestarse de forma tardía en la edad adulta pero que tampoco guardaban relación con el fenotipo fetal. Un 61,5 por ciento (32/52) de los diagnósticos genéticos fueron mutaciones de novo, y un 36,5 por ciento (19/52) tenían HAR o HAD. Tras la corrección por pruebas múltiples, la detección de variantes patogénicas fue significativamente mayor en fetos con anomalías multisistémicas con respecto al resto de fenotipos. Se afirma que, durante los embarazos, los diagnósticos de este estudio hubieran podido mejorar el manejo postnatal y la toma de decisiones, aunque no hubieran podido ofrecer ningún tratamiento intrauterino. Dispusieron de un seguimiento postmortem o postnatal en 47/52 (90,4 por ciento) de los fetos diagnosticados, siendo consistente con el diagnóstico molecular. Se obtuvieron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en 27/192 (14,1 por ciento) fetos que no sobrevivieron más allá del nacimiento, que fue significativamente mayor que las variantes halladas en aquellos que nacieron vivos (20/282; 7,1 por ciento). Contando los diagnósticos definitivos y las VOUS con significación clínica, se obtuvo un resultado satisfactorio en 76/610 fetos (12,5 por ciento), y el mayor estudio que se había hecho previamente a este (ochenta y cuatro fetos fallecidos) halló un rendimiento de un veinte por ciento. Esto creen que es porque en el estudio PAGE no se hizo una revisión genética previa, y también porque el sesenta por ciento de los fetos incluidos en la cohorte nacieron vivos (tienen menos probabilidades de presentar trastornos genéticos que los fallecidos), además, en el estudio que comentamos se incluyeron numerosos fenotipos que tenían baja asociación con los trastornos monogénicos (baja TN aislada, defectos del tubo neural, etc.), y la visualización de este fenotipo está mucho más limitada. Destacan que las variantes en el gen KMT2D fueron uno de los hallazgos diagnósticos más frecuentes, y estaban a su vez asociadas a distintos fenotipos: anomalías multisistémicas, defectos cardíacos complejos aislados e hidropesía fetal e higroma quístico. Las mutaciones de KMTD2 causan el síndrome de Kabuki, que en el periodo postnatal provoca epilepsia, retraso en el desarrollo, alteraciones cardíacas, genitourinarias, musculoesqueléticas y rasgos faciales distintivos. Estos rasgos suelen aparecer en niños más mayores, lo que dificulta el diagnóstico del síndrome en el periodo postnatal temprano. Afirman que WES prenatal aumenta su rendimiento al realizar las pruebas en trío, y que se requiere de un equipo multidisciplinar para la correcta interpretación de los resultados. Señalan la necesidad imperante de crear listas de genes relacionados con los trastornos en el desarrollo asociados a los fenotipos fetales que pueden producir, pudiendo crear paneles dirigidos más específicos y disminuyendo así significativamente los VOUS.

Existe también un artículo publicado en este año en la *European Journal of Human Genetics* (Meier et al., 2019) que se basa en un estudio en el que emplearon la WES prenatal en una cohorte de diecinueve familias con uno o más fetos afectados por un patrón de alteraciones ecográficas distintivo. En 6/19 (31,5 por ciento) se logró obtener un diagnóstico definitivo de variantes conocidas o nuevas en genes de enfermedades reconocidas o de variantes en genes de enfermedades nuevas que proporcionaban nuevos fenotipos fetales. En la cohorte de este estudio había veintiséis fetos (con muerte fetal o interrupción del embarazo) y un niño en las diecinueve familias, presentando todos anomalías graves en el estudio ecográfico. Los criterios de inclusión que usaron fueron: feto con dos o más anomalías que sugirieran un trastorno genético, recurrencia familiar del fenotipo observado, datos clínicos detallados de los hallazgos ecográficos o de la autopsia fetal y análisis de microarray cromosómico de alta resolución con resultado normal. Identificaron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en doce de las diecinueve familias (sesenta y tres por ciento), y se alcanzó un diagnóstico definitivo en la mitad de ellas (6/12; cincuenta por ciento), mientras que las otras seis se debieron clasificar como variantes de significación desconocida según las directrices del ACMG. Dentro de las seis variantes que llevaron al diagnóstico definitivo, las que clasificaron como variantes conocidas o nuevas en genes patológicos que explicaban las anomalías fetales fueron: una variante homocigótica en el gen *MKS1*, que provocaba un fenotipo recurrente similar al síndrome de Meckel-Gruber, una variante de novo en el gen *OTX2*, que provoca un fenotipo de agnathia-otocefalia, una variante de novo en el gen *FGFR2*, que dio lugar a un fenotipo relacionado con el síndrome de Apert y una variante homocigótica en el gen *RYR1*, que causó una hidropresía fetal e hipoplasia muscular grave. Las dos restantes las clasificaron como variantes en nuevos genes confirmados como causantes de nuevos fenotipos fetales: unas variantes truncantes heterocigotas compuestas en el gen *CENPF*, que se asociaron con un fenotipo variable, y nuevas variantes truncantes heterocigotas en el gen *KIF14*, que podían manifestarse como una microcefalia aislada. Dentro de los seis casos en los que encontraron variantes probablemente patogénicas por revisión clínica y funcional hubo tres variantes (genes *SMAD3*, *KIF4A*, *PIGW*) de las que se conoce que otras variantes en el mismo gen causan un fenotipo postnatal que difiere del observado en el feto, y las otras tres variantes (genes *TTC28*, *PTK7*, *DNHD1*) no se sabe que causen un fenotipo específico en el humano en general. También mencionaron nuevos genes candidatos, como el gen *PTK7*, cuya alteración se propuso como causante de un fenotipo fetal con múltiples anomalías cerebrales, espina bífida, anoftalmia unilateral y atresia de los conductos biliares. Otro gen candidato fue *DNHD1* en un feto con un fenotipo de defecto cardíaco con corazón y aorta ascendente hipoplásicas, atresia de válvula mitral subtotal, vena

cardinal persistente y defecto del tabique auricular, lóbulos pulmonares fusionados, agenesia de vesícula biliar y rotación intestinal incompleta. El último gen candidato fue TTC28, en varios fetos con atresia intestinal en la misma familia. En este estudio señalan que las seis variantes probablemente patogénicas pueden no tener relevancia clínica en el momento actual, pero que pueden guiar la futura búsqueda de más pacientes afectados para tratar de obtener pruebas confirmatorias.

El artículo de Koning et al. (2019) se basa en un estudio realizado para valorar el impacto clínico que tendría la implementación de WES prenatal en los embarazos en curso. Hicieron un análisis retrospectivo de 22 embarazos en los que se observaron anomalías estructurales fetales por ecografía. La WES prenatal tuvo un impacto clínico en 14/20 (setenta por ciento) casos. Los dos casos no incluidos hallaron un diagnóstico mediante arrays CGH, y por tanto se excluyeron del estudio. Introdujeron un límite de edad gestacional que fue de 22+0 semanas, para tratar de conseguir un diagnóstico antes de la semana veinticuatro (límite legal de TOP en Países Bajos), y también incluyeron a aquellas pacientes que se plantearon solicitar una interrupción tardía debido a los hallazgos extremadamente graves, y aquellas que querían continuar con el embarazo, pero deseaban obtener información para el manejo pre o perinatal. Definieron el impacto clínico como: influir significativamente en la decisión sobre una TOP, apoyar la solicitud de una TOP tardía (>24 semanas) o modificar el manejo pre o perinatal previsto. Realizaron análisis en tríos y usaron un panel de genes DDG2P, y si no hallaban variantes en este, pasaban a un análisis del exoma completo. Las variantes que encontraron se clasificaron según las directrices del ACMG, las VOUS solo se comunicaron si se consideraron potencialmente relevantes y los hallazgos secundarios fueron comunicados si los padres habían dado su consentimiento. El TAT (tiempo de respuesta) que lograron fue inferior a los diecisiete días en los veinte casos secuenciados, excepto en uno de ellos en el que hubo que repetir la amniocentesis. Se clasificó a las pacientes en tres grupos; el primero estaba formado por doce padres que requerían ayuda en su proceso de decisión, ya que los fetos presentaban anomalías operables o con pronóstico bueno-moderado en ausencia de síndrome genético, pero se sospechaba que este podría estar presente. Obtuvieron un diagnóstico genético con WES en 4/12 (treinta y tres por ciento) de ellos, y en los cuatro casos la información obtenida apoyó la decisión de realizar un TOP, indicando los padres de tres de ellos que hubieran continuado el embarazo en ausencia de este diagnóstico genético. En 8/12 embarazos el WES no halló una variante patogénica, pero se hallaron dos hallazgos secundarios en dos de ellos, y uno de ellos murió tras el nacimiento. En uno de los otros seis fetos sin diagnóstico se optó por TOP basándose en los hallazgos ecográficos, otro

terminó en muerte intrauterina a las veintiún semanas de gestación, y los cinco restantes continuaron el embarazo y los padres afirmaron que el resultado negativo de WES había sido clave para tomar esta decisión, por lo que en total calcularon que existió un impacto en 9/12 embarazos (setenta y cinco por ciento). El segundo grupo lo conformaron pacientes que se habían planteado solicitar una TOP tardía; eran cinco embarazos, y en dos de ellos los resultados de WES apoyaron la decisión de realizar una TOP tardía debido al pronóstico extremadamente malo que presentaban los fetos. En el tercer grupo incluyeron a pacientes que querían información sobre cómo guiar el manejo pre o perinatal, y en 2/3 (66,6 por ciento) embarazos se identificó una causa genética. En uno de ellos el embarazo terminó con una muerte intrauterina a las treinta y cinco semanas de gestación, en otro se halló un diagnóstico del síndrome de Kabuki y se planeó el cuidado postnatal óptimo, y a pesar de proporcionárselo, el neonato falleció a los diecisiete días de vida. En el último caso no lograron un diagnóstico definitivo, pero encontraron un hallazgo secundario y se actuó en consecuencia mejorando la hidropesía fetal que presentaba, nació vivo y a los seis meses presenta desarrollo normal con varios rasgos dismórficos. El elevado impacto clínico que se muestra en este estudio estaba influido por los criterios de selección que aplicaron, que trataban de maximizar la posibilidad de diagnóstico genético. Este estudio apoya la introducción de la WES prenatal, y señala la necesidad de contar con paneles de genes diseñados específicamente para estudios prenatales.

El estudio de Choy et al. (2019), trata de probar la utilidad clínica de la WGS (secuenciación del genoma completo) en fetos con TN aumentada ($>3,5$ mm). La cohorte estudiada estaba formada por cincuenta fetos, y de ellos treinta y cuatro presentaban un aumento aislado de la TN y dieciséis asociaban esa TN aumentada con otras anomalías estructurales. El cariotipo y el arrays CGH hallaron un diagnóstico en 8/50 fetos (dieciséis por ciento) y la WGS consiguió diagnosticar a 16/50 (treinta y dos por ciento). Los resultados de este estudio apoyan el uso de la WGS junto a las técnicas diagnósticas tradicionales en fetos con un aumento de la TN. En este artículo se afirma que los estudios que se habían realizado sobre el rendimiento diagnóstico de WES prenatal habían concluido en que esta técnica proporciona un diagnóstico entre el 9,1-32 por ciento de los casos, y, sin embargo, cuando comentaban los resultados en fetos con aumento de la TN aislada o acompañada de otras malformaciones, el rendimiento decaía a entre un 3,2-21 por ciento. Afirman que casi todos estos estudios estaban centrados en cohortes prenatales y en la técnica de WES prenatal, que es incapaz de detectar reordenamientos estructurales aparentemente equilibrados o variantes estructurales. En este estudio se utiliza WGS en lugar de WES, y desde el año 2014

hasta el 2018 se reclutaron cincuenta mujeres embarazadas cuyos fetos presentaban un aumento de la TN $>3,5$ mm con/sin malformaciones estructurales asociadas. Comparando los resultados que obtuvieron con el arrays y con la WSG, esta última no solo detectó todas las VNC P/LP y VOUS detectables, sino que también aportó hallazgos adicionales, como un síndrome de Turner en mosaico, un caso de delineación completa de VNC en un caso con síndrome de delección recurrente y dos VOUS adicionales. No encontraron diferencias significativas en el rendimiento diagnóstico de la WGS para el grupo de fetos con TN aumentada aislada y el grupo de fetos con más anomalías estructurales. La tasa de diagnóstico global fue de un treinta y dos por ciento, que es el doble del rendimiento obtenido mediante cariotipo y CMA. Este resultado justifica la realización de otro estudio con una mayor cohorte para poder confirmar la utilidad clínica de la WGS en el diagnóstico prenatal de fetos con aumento de la TN, ya que el estudio comentado tiene limitaciones importantes, como el pequeño tamaño de la cohorte o el enfoque retrospectivo que presenta. Se señala que la WGS tiene una mayor sensibilidad para la detección de trastornos numéricos en mosaico y la delineación exhaustiva de CNVs P/LP, pudiendo identificar mutaciones puntuales causantes y reordenamientos estructurales equilibrados que no se podrían hallar con las técnicas habituales de diagnóstico prenatal.

En el año 2020 se publicó un artículo (Deden et al., 2020) en el que se comenta un estudio realizado en una cohorte de cincuenta y cuatro casos de análisis mediante WES prenatal tras la detección de anomalías ecográficas no seleccionadas, hallando un diagnóstico en 18/54 (treinta y tres por ciento) de los casos. Las anomalías identificadas y diagnosticadas con mayor frecuencia fueron displasia esquelética (11/18; sesenta y un por ciento), fetos con anomalías congénitas múltiples (4/18; veintidós por ciento) y anomalías estructurales intracerebrales (3/18; diecisiete por ciento). Una novedad que aporta este estudio es el impacto en la toma de decisiones clínicas, que se calculó como relevante en un sesenta y ocho por ciento de los casos. Utilizaron la técnica de secuenciación rápida del exoma completo (rWES), que tuvo una mediana de tiempo de respuesta de diez días. Los pacientes recibieron asesoramiento genético especializado previo y posterior a la prueba, y se obtuvieron los consentimientos informados pertinentes. Para este estudio se usaron doce paneles de genes para fenotipos diferentes, cuyo tamaño fue variable. El estudio se hizo por niveles, si con el primer nivel de análisis no se obtenían resultados podía pasarse a otro nivel en el que se analizara todo el mendelioma. Antes de la realización de WES se excluyeron anomalías detectadas por QF-PCR o por arrays. Los paneles de genes que más usaron fueron “trastornos hereditarios mendelianos” (cincuenta y nueve por ciento) y “baja

estatura/displasia ósea” (cuarenta y tres por ciento). Hubo un setenta y dos por ciento de trastornos de HAD y un veintiocho por ciento de HAR. La influencia de los resultados del WES en la toma de decisiones perinatales se realizó mediante unas encuestas que los clínicos entregaron a los pacientes para recoger datos adicionales, y un impacto relevante se definió como: optar por un TOP antes de las veinticuatro semanas de gestación (límite legal en los Países Bajos), solicitar una TOP tardía tras las veinticuatro semanas de gestación (solo es legal cuando es inminente un resultado fetal grave), continuar con el embarazo o ajustar un tratamiento periparto. La tasa de respuesta fue de un sesenta y nueve por ciento (37/54), y el rendimiento diagnóstico fue de un treinta y cinco por ciento para los que respondieron y de un veintinueve por ciento para los que no respondieron. De los treinta y siete casos que respondieron, se informó de que la WES había contribuido a la toma de decisiones en 25/37 (sesenta y ocho por ciento), a pesar de que en once de estos veinticinco casos no se había identificado un diagnóstico genético. En seis casos el resultado de WES influyó sobre el manejo clínico prenatal o periparto. El rendimiento de WES en este estudio (treinta y tres por ciento) es comparable al de otros estudios sin preselección de determinados fenotipos clínicos (18-40 por ciento), y sin embargo es menor al de estudios que han realizado una preselección de ciertos fenotipos, por ejemplo, de las anomalías esqueléticas, que han obtenido rendimientos diagnósticos de hasta un ochenta y un por ciento (13/16). Este, junto con otros estudios, justifican la adopción de la WES prenatal, y una de las razones más importantes para defenderla es la capacidad que tiene de influir en la toma de decisiones clínicas prenatales y periparto, y el hecho de que incluso con un resultado de WES negativo exista un impacto relevante en esta toma de decisiones (cuarenta y cuatro por ciento de impacto con WES negativa).

Xue (2020) se centra en estudiar una cohorte de 374 embarazos únicos en los que se halló una TN aumentada aislada y a los que se sometió a un diagnóstico mediante análisis de microarrays cromosómicos (CMA), hallando un diagnóstico en 100/274 casos (26,7 por ciento) y ocho VOUS. La tasa de detección más alta se dio en el grupo de $TN > 5,5$ mm, que fue de un 54,5 por ciento. De los casos en los que no se consiguió llegar a un diagnóstico, veinticuatro accedieron a someterse a la técnica de WES prenatal, encontrando tres variantes probablemente patogénicas y dos VOUS. El diagnóstico prenatal invasivo suele proponerse en aquellos fetos con valores de $TN > 3,5$ mm. En los veinticuatro casos con resultado negativo en CMA que decidieron someterse a la técnica de WES prenatal se encontraron tres variantes probablemente patogénicas: dos mutaciones dominantes de novo en el gen *SOS1* y una mutación heterocigota compuesta de HAR en el gen *PIGN*, y además de esto, se encontraron dos VOUS. La

WGS o la WES revelaron un rendimiento diagnóstico adicional al aportado por la CMA y el cariotipo convencional que varió entre un 3,2 y un treinta y dos por ciento, y por ello se justifica el recurrir a estas técnicas en casos con hallazgos negativos en estas pruebas.

El último artículo que incluimos en 2020 (Diderich et al., 2020) se basa en un estudio retrospectivo realizado sobre una cohorte de 391 embarazos que fueron reclutados entre el año 2013 y el año 2016, a los que se realizó WES prenatal tras presentar anomalías estructurales en la ecografía y un resultado normal en el arrays. La mayoría de los casos se sometieron a una prueba de secuenciación dirigida, y en ciento cincuenta y nueve casos se hizo una secuenciación completa del exoma. En un 19,4 por ciento de los casos las pruebas moleculares llevaron a un diagnóstico genético (76/391), y 73/76 casos (91,1 por ciento) obtuvieron este diagnóstico mediante WES. En esos tres casos se vio una hipometilación de H19 que provoca el síndrome de Silver-Russell, y esto no se puede detectar por WES prenatal, por lo que el rendimiento se quedó en un 18,7 por ciento (73/391). La WES prenatal ofrecida por un genetista clínico experto tuvo la capacidad de detectar variantes probablemente patogénicas en el 18,7 por ciento de los fetos de esta cohorte. Se ofreció a los padres un asesoramiento genético previo a las pruebas y tras esto se pasó a las pruebas moleculares, que fueron dirigidas o completas: las pruebas dirigidas (TMT) podían ser hacia un trastorno individual con secuenciación de Sanger de pocos genes asociados al mismo trastorno, o un análisis de múltiples genes a través de paneles de secuenciación de nueva generación (NGS) para trastornos individuales. Estas pruebas dirigidas se hicieron cuando el fenotipo fetal indicaba un trastorno monogénico específico. Las pruebas moleculares amplias (NSG dirigidos a múltiples trastornos / WES) se realizaron cuando los hallazgos no eran indicativos de un trastorno específico, pero sí eran indicativos de una etiología genética. Los paneles más usados fueron el de malformaciones genéticas múltiples y el de discapacidad intelectual, y el análisis se realizó en tríos. Las variantes se clasificaron según las Normas y Directrices para la Interpretación de las Variantes de Secuencia del ACMG, y se tuvieron en cuenta las patogénicas y las probablemente patogénicas, excluyéndose las variantes de significado incierto. En esta cohorte de 391 embarazos incluyeron anomalías fetales independientemente de su gravedad, y las clasificaron en cuatro grupos: el primero estaba formado por 251 fetos con una o más anomalías importantes en un único sistema orgánico, y también aquellos que tenían anomalías estrictamente aisladas (ej. TN > 3,5 mm, labio leporino, etc.), en el segundo grupo había veintiséis casos con una única anomalía importante que se acompañaba de uno o más marcadores blandos en un sistema orgánico diferente, en el tercer grupo

había noventa y tres casos con dos o más malformaciones importantes en diferentes sistemas orgánicos y en el cuarto grupo había veintiún casos con únicamente marcadores blandos. Los síndromes que más frecuentemente diagnosticaron fueron el síndrome de Noonan y la fibrosis quística. El mayor rendimiento diagnóstico se dio en fetos con anomalías multisistémicas (27/93; 29 por ciento), y debemos tener en cuenta que la mayor parte de los fetos incluidos en este estudio presentaban anomalías en un solo sistema, que dieron un diagnóstico en 42/251 casos (16,7 por ciento). La selección cuidadosa de casos por parte de genetistas clínicos y los fetos con anomalías multisistémicas provocan un alto rendimiento diagnóstico de la WES prenatal, y la selección de esta cohorte de estudio es probablemente el factor más determinante de la variabilidad del rendimiento de WES en los estudios publicados. Los autores señalan que los estudios prospectivos a gran escala realizados previamente tienen un menor rendimiento diagnóstico usando WES prenatal debido a que ninguna de las cohortes fue seleccionada por genetistas clínicos, y a pesar de ello el rendimiento fue suficiente para concluir que la WES prenatal sería de gran utilidad diagnóstica.

7.2.- FACTORES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO CON WES:

Introducimos aquí un artículo (Best et al., 2018) en el que mostró una revisión de treinta y un estudios publicados en el periodo 2014-2017 sobre WES prenatal, que identificaban tasas de diagnóstico de entre el 6,2 por ciento y el ochenta por ciento. De los treinta y un informes que recogieron, diez eran casos individuales y cinco eran pequeñas series de dos a cuatro casos fetales. Afirman en esta revisión que el uso de tríos es un factor de confusión importante, ya que aumenta considerablemente la tasa de diagnóstico con respecto al análisis de solo probando. Había dieciséis estudios restantes en esta revisión que incluían cinco o más casos fetales, y el rendimiento de la WES prenatal osciló entre un 6,2 y un 80 por ciento, dependiendo de diversos factores como la selección de los casos, la presencia de anomalías múltiples o aisladas, qué sistema orgánico fetal estaba afectado o la consanguineidad de los padres. En general destacaron la importancia de priorizar los casos con alto riesgo de padecer un trastorno monogénico, la exclusión previa de un diagnóstico por pruebas genéticas convencionales y el uso de técnicas de WES en trío para incrementar el rendimiento diagnóstico de WES.

En el año 2018 se publicó una continuación de un estudio mencionado en el apartado anterior (Yadaba & Ashkinadze, 2017), y en esta continuación (Yadaba, 2018) se trataron de resumir los criterios que habían logrado aumentar el rendimiento diagnóstico de la WES prenatal en su anterior estudio (que obtuvo un rendimiento del ochenta por

ciento) y se desarrollaron con más detalle los resultados obtenidos en los 4/5 casos que hallaron un diagnóstico. Se mencionó que los fetos incluidos presentaban un cariotipo y un análisis de microarrays normal, y que las características que seleccionaron para ver su asociación con una mayor tasa de diagnóstico fueron la consanguineidad de los padres, las grandes regiones de homocigosidad en el microarray fetal y la alta probabilidad de presentar un trastorno monogénico según las anomalías ecográficas. También usaron la técnica en tríos. Afirmaron que otros factores que aumentan el diagnóstico según la literatura son las anomalías múltiples o aquellas que afectan a sistemas orgánicos concretos como el sistema nervioso, la displasia esquelética y las anomalías del tracto renal y urinario. Concluyen en este estudio posterior que las características seleccionadas para la inclusión de los casos en el estudio contribuyeron a aumentar significativamente el rendimiento diagnóstico de WES prenatal.

Veyver & Eng (2015) también señalan que en los estudios sobre WES prenatal se destaca el mayor rendimiento en el análisis de muestras en trío (padre, madre, feto; de un cuarenta y un por ciento) con respecto al de únicamente probandos (nueve por ciento). Talkowski & Rehm (2019) en su revisión afirman que el estudio PAGE destacó que el rendimiento era mucho mayor en fetos con anomalías estructurales fetales multisistémicas que en aquellos que tenían una TN aumentada aislada, y el de Petrovski también señaló que el rendimiento era mayor en aquellos fetos que presentaban anomalías multisistémicas. El autor comenta que en ambos estudios subrayaron la importancia de la predicción computacional de las variantes cuando se incluyan genes sin una correspondencia fenotípica conocida, pero a pesar de ello los dos señalan que es importante examinar detalladamente las variantes que coincidan con el fenotipo, y realizar una correcta revisión manual y reinterpretación futura.

En el artículo de Monaghan et al. (2020) señalan puntos que deben ser considerados en la realización de la prueba de WES prenatal, siguiendo las directrices publicadas por el ACMG. Una de estas consideraciones es que, previamente a la prueba, los fetos deben haber obtenido un resultado negativo en las pruebas tradicionales (cariotipo, CMA), y si se sospecha de un trastorno específico, la prueba de primera línea debería ser una prueba de un solo gen o de un panel de genes dirigido. Señalan que el profesional sanitario deberá proporcionar toda la información fenotípica que posea sobre cada caso, ya que esto contribuirá a una interpretación más precisa de los resultados. Abogan por un análisis en trío, ya que permite la identificación inmediata de variantes de novo, la determinación de la fase de las variantes bialélicas y la confirmación del estado de portador en el caso de variantes homocigóticas. Destacan que se debe proporcionar un asesoramiento genético previo a la prueba y un consentimiento informado en el que los pacientes puedan optar por no ser informados de los hallazgos

secundarios definidos por el ACMG, los hallazgos incidentales y las variantes en genes no relacionados con la enfermedad. Afirman que el tiempo de respuesta de la WES prenatal debe ser rápido para poder influir en la decisión reproductiva. Se deben informar las variantes patogénicas y probablemente patogénicas usando las directrices del ACMG, y también se debe considerar informar de los VOUS en los genes que se ajusten al fenotipo fetal. En cuanto a los genes de significado incierto, afirman que puede haber variantes con un nivel de asociación limitado y basado en datos internos de laboratorio, modelos animales o un número limitado de informes de casos publicados, y los laboratorios deben ser claros sobre si se informará solo de los genes patógenos conocidos o también de aquellos que son candidatos a serlo. En cuanto a los hallazgos incidentales recomiendan informar de aquellas variantes de alta penetrancia que se detecten en genes no relacionados con el fenotipo fetal, pero que sabemos que pueden causar trastornos en la infancia. No recomiendan informar de aquellas que no se relacionan con un fenotipo fetal o infantil conocido, y tampoco del estado de portador fetal de trastornos autosómicos recesivos o ligados al cromosoma X no relacionados con el objetivo de la prueba. En cuanto a los hallazgos incidentales en los padres, afirman que el laboratorio debe establecer políticas para la notificación de estos, y también para informar sobre el estado de portador para trastornos recesivos y ligados al cromosoma X, recomendando que se limite a informar de las variantes patogénicas o probablemente patogénicas. También señalan que las políticas del laboratorio deben indicar la posible revelación de un posible parentesco mal atribuido o consanguineidad entre los padres. En cuanto a las consideraciones que destacan después de la prueba, recomiendan proporcionar un asesoramiento genético profesional. Mencionan que el reanálisis de los datos de WES después de doce meses aportará un aumento del rendimiento diagnóstico para aquellos pacientes con un resultado inicial negativo. Esto se consigue con el desarrollo del fenotipo durante el crecimiento del paciente y con la actualización continua de las bases de datos y la clasificación de las variantes. Por último, se recomienda realizar la técnica de WES prenatal a pacientes cuidadosamente seleccionados para así optimizar el rendimiento de la prueba.

7.3.-BENEFICIOS Y LIMITACIONES DE WES:

7.3.1.- Beneficios:

Best et al. (2018) en su artículo recalcó que, cuando se logra un diagnóstico prenatal mediante WES, este aporta numerosos beneficios, destacando entre ellos:

- Ayudar a la toma de decisiones reproductivas sobre el embarazo en curso.
- Evitar la odisea diagnóstica y la estancia hospitalaria que supone no conocer el

trastorno genético tras el nacimiento.

- Aportar información útil para abordar el manejo, los cuidados paliativos o el posible tratamiento intraútero que el feto podría recibir para contribuir a mejorar su situación clínica, ya que actualmente pueden intervenir anomalías como la hernia diafragmática congénita (mediante oclusión endotraqueal) o anomalías cardíacas, como el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico

- Orientar los planes de parto para reducir la morbilidad y mortalidad del recién nacido. Ej. El déficit de piruvato deshidrogenasa se puede presentar de forma prenatal como anomalías cerebrales fetales (ventriculomegalia o disgenesia cerebral), y el diagnóstico puede orientar a un tratamiento postnatal inmediato para corregir la acidosis e introducir una dieta cetogénica con suplementos de tiamina.

- Permitir un correcto asesoramiento a las familias sobre el riesgo de recurrencia y la preparación para las pruebas prenatales o el diagnóstico genético previo a la implantación en embarazos futuros.

Además, comentan que los estudios con WES prenatal han logrado describir fenotipos fetales que no se conocían previamente y relacionarlos con enfermedades mendelianas sí conocidas.

Alamillo et al. (2015) habla en su artículo sobre la conveniencia de la realización de WES en aquellos pacientes que requieren someterse a una inmensa cantidad de pruebas invasivas y costosas para obtener raramente un diagnóstico de su afección genética, ahorrándoles con el diagnóstico temprano por WES un gran sufrimiento, y abaratando en gran medida todo el proceso que debían soportar. Señala que en 2012 la Junta Directiva del ACMG publicó unas directrices sobre el correcto uso de esta técnica en un individuo fenotípicamente afectado (en el ámbito postnatal), y que en aquel momento era ya una opción clínicamente disponible. Veyver & Eng (2015) señalan que estas técnicas de secuenciación han aumentado significativamente el número de genes que conocemos como causantes de trastornos mendelianos, pasando de unos tres mil genes antes de su existencia a unos 4600 genes para la fecha de 2014. Meier et al. (2019) señala que existe una proporción de fenotipos anómalos en la época prenatal que son específicos de la vida fetal, y que no han podido ser descritos hasta ahora porque suelen conducir a la letalidad embrionaria, fetal o perinatal, y por ello no se han llegado a investigar. También apuntan a que es posible que existan fetos que tengan una presentación alélica incompleta o grave de un fenotipo que se ha descrito como postnatal, pasando el diagnóstico desapercibido durante la época prenatal. Todo esto podrá investigarse gracias a las nuevas técnicas de secuenciación. Los autores apuntan que las variantes probablemente patogénicas pueden no tener relevancia clínica en el momento en el que se estudian, pero que pueden guiar la futura búsqueda de más

pacientes afectados para tratar de obtener pruebas confirmatorias y nuevos diagnósticos.

7.3.2.- Retos y limitaciones:

Alamillo et al. (2015) también admite que los mayores retos que se derivan de la técnica de WES prenatal son la interpretación de los resultados y la posibilidad de encontrar hallazgos desconocidos o inciertos. No está claro cómo los profesionales médicos debemos enfrentarnos al dilema ético sobre si informar o no a la familia de estos. La declaración política del ACMG de 2015 afirma que “Debe seguirse la misma política en los niños (y fetos) que en los adultos; es decir, debe realizarse de forma rutinaria el análisis de un conjunto de genes seleccionados para identificar las variantes patogénicas asociadas con enfermedades graves pero prevenibles. Los padres deben tener la opción durante el proceso de optar por no realizar dicho análisis”. Veyver & Eng (2015) afirma que el principal problema del uso de WES radica en que no contamos con la información suficiente como para poder interpretar y clasificar de forma precisa todos los resultados que podemos obtener. También nos aporta información genética que no tiene relación con la razón inicial de la búsqueda, y su descubrimiento y posible comunicación a la familia afectada supone bastantes problemas éticos. Además, existe el reto de obtener resultados a tiempo para que la familia pueda tomar decisiones relevantes en la gestación en curso. Continúa mencionando el elevado coste y la carga financiera que supone (esperan que vaya disminuyendo progresivamente), las expectativas de rendimiento de las pruebas (en 2015 era de un veinticinco por ciento, también esperan que aumente y además poder hacer un reanálisis de pacientes que no han sido diagnosticados por no conocer la alteración que presentaban en el momento de la prueba, pero que esta sí pueda estar descrita en un futuro), la necesidad de un asesoramiento genético adecuado (faltan profesionales especializados en aportar información correcta a la familia), la existencia de un consentimiento informado y unas directrices de actuación claras y universales para saber cómo actuar ante los resultados de la prueba, y los posibles hallazgos accidentales, la posibilidad de encontrar variantes o secuencias heredadas que puedan afectar a toda una familia, la privacidad y confidencialidad de la información genética de los pacientes y el re análisis y reclasificación de los datos que se vayan obteniendo a lo largo de los años de estudio e investigación. Mone et al. (2019) afirma en su artículo que para la correcta implementación de la NGS en la práctica clínica se requiere un equipo multidisciplinar que interprete adecuadamente las variantes y un asesoramiento genético previo y posterior a la prueba para los padres, en el que estos comprendan el nivel de incertidumbre que puede surgir de los resultados de esta técnica, y la posibilidad de que

existan hallazgos secundarios o incidentales. También deben saber que la NGS está evolucionando continuamente, y que es posible que una variante que en el momento de la prueba no estuviera registrada como patogénica en un futuro sí lo esté. Requeriremos de un fenotipado preciso, con una clasificación que use sistemas como la Ontología del Fenotipo Humano, ya que el panel del exoma clínico dirigido aporta un enfoque más eficiente que la WES, pero aumenta la necesidad de contar con un fenotipo preciso y profundo. Señalan que para la implementación clínica también necesitamos que el análisis sea en tríos, habrá que mejorar la interpretación mediante herramientas bioinformáticas, crear bases de datos de variantes específicas y directrices reconocidas, validar estas variantes patogénicas mediante la secuenciación de Sanger y obtener un tiempo de respuesta adecuado para permitir a los padres tomar decisiones sobre la gestión del embarazo.

7.4.- RESULTADOS DE WES PRENATAL EN EL C.H.U.B.:

PACIENTE 1

Mujer de treinta y cinco años, embarazada de veinticuatro semanas de gestación, cuyo feto presentaba en la ECO previa múltiples anomalías ecográficas: pies zambos, manos en garra, derrame pleural y polihidramnios. La paciente se somete a una prueba invasiva para la obtención de una muestra de líquido amniótico y a la realización de pruebas de diagnóstico genético, hallándose un cariotipo por bandas G en líquido amniótico masculino normal (46, XY), y unos resultados del análisis genotipado por array (CGH) con dotación normal de cromosomas trece, dieciocho y veintiuno. Se descartan alteraciones numéricas de tipo euploidía y aneuploidía de los cromosomas mencionados y no se detectan alteraciones en los cromosomas sexuales. Tampoco se detectaron variantes en el número de copias en la muestra que pudieran relacionarse con el fenotipo del paciente. Ante los graves hallazgos ecográficos, se plantea el caso en el comité ético para poder autorizar un aborto posterior al límite legal establecido (veintidós semanas), y se realiza IVE a la semana veinticuatro de gestación, sin dar tiempo a la obtención de resultados de pruebas de WES. Tras estas dos técnicas con resultados normales (cariotipo, arrays) se procedió también al análisis mediante NSG, utilizando una técnica de WES dirigida a un panel de genes relacionados con trastornos neuromusculares. Este panel fue obtenido de Genomics England PanelApp. Se analizaron las variantes encontradas en aquellos genes clasificados como relacionados con el fenotipo del feto de la paciente, y también se analizaron aquellos para los cuales hay suficiente información en la literatura que los puede relacionar con el fenotipo fetal. La generación de las librerías, secuenciación y análisis bioinformático del exoma fue

realizada por el laboratorio Imegen, y la interpretación de las variantes halladas estuvo a cargo de los facultativos del servicio de inmunología y genética. La profundidad media de lectura fue de 112X, y la cobertura a más de un 20X de profundidad fue del noventa y siete por ciento. En los resultados se detectaron dos variantes en el gen RYR1 que podían relacionarse con el fenotipo fetal: la primera variante no estaba descrita en la base de datos de controles (población sana) GnomAD. Tampoco aparecía en las bases ClinVar ni DECIPHER. Fue clasificada como variante patogénica, ya que produciría la pérdida del exón diez, que conduciría a la pérdida de función de la proteína. Esta variante tenía herencia paterna. La segunda variante de este gen RYR1 fue heredada de la madre, y fue clasificada como probablemente patogénica. El gen RYR1 se asocia a diferentes tipos de trastornos musculares y a una mayor susceptibilidad a padecer hipertermia maligna, debiendo incluirse esta información en el consejo genético a los pacientes. Las alteraciones de este gen pueden heredarse de forma dominante o recesiva, y hay múltiples enfermedades asociadas a la pérdida de función de este gen. Entre aquellas que tienen HAR están la miopatía congénita por desproporción de tipo de fibra (CFTD) y la enfermedad multiminicore (MmD). Entre aquellas con HAD nombran la enfermedad del núcleo central y la susceptibilidad a la hipertermia maligna. Se cree que un 70-80 por ciento de los casos de susceptibilidad a la hipertermia maligna están asociados a variantes en el gen RYR1. En el informe mencionan que hay un artículo de un caso de feto con higroma quístico, cráneo anormal, pie zambo y escasos movimientos con dos variantes en heterocigosis compuesta en el gen RYR1, y en otro artículo describieron otras dos variantes en heterocigosis compuesta en el gen RYR1 en un feto con hidrops fetal, múltiples contracturas e hipoplasia pulmonar. Se hizo también una revisión de la literatura previa asociada a las alteraciones de este gen, mencionando estudios como el de Sambuughin et al (2001), el de Rossi et al (2009) y el de Monnier et al (2009). Tras obtener estos resultados se concluyó que las variantes encontradas en el gen RYR1 eran probablemente la causa del fenotipo fetal anómalo, y se procedió a informar a la familia de los hallazgos encontrados junto a un asesoramiento genético especializado. Se encontraron algunas variantes de significación incierta que no se notificaron al no considerarse relacionadas con el fenotipo fetal ni tener significancia clínica. Para clasificar las variantes se usaron los criterios del ACMG y de la Asociación de Patología Molecular. Entre las limitaciones de esta prueba nombramos que no puede detectar alteraciones en genes no presentes en el kit empleado, regiones genómicas con menos de 20 lecturas, cambios en regiones repetitivas y deleciones o inserciones de más de dieciocho pb. En el informe de laboratorio se refiere que existe la posibilidad de una nueva revisión del paciente, al menos un año después de esta, para reevaluar las variantes halladas y los genes

analizados. Se proporcionó asesoramiento genético preconcepcional a la pareja afectada, y se les informó de las tres opciones existentes si deseaban descendencia sana: el diagnóstico preimplantacional (técnica invasiva que tiene un treinta por ciento de efectividad por embrión implantado), embarazo espontáneo con posterior estudio genético prenatal sobre muestra de líquido amniótico en la semana dieciséis de gestación, o recibir donación de semen o de óvulo. La pareja decidió intentar un embarazo espontáneo con estudio genético posterior, y actualmente la paciente está embarazada, se ha realizado el estudio genético de su feto y los resultados de la WES prenatal han dado negativos, el feto no es portador de la variante patogénica del gen RYR1 y la pareja espera descendencia sana.

PACIENTE 2

Mujer de treinta y siete años, embarazada, que presenta antecedentes personales de talla baja y escoliosis importante que precisó de un corsé veintitrés horas al día durante dos años. Actualmente la madre presenta un perímetro craneal en -2,25 DE, una talla de 1,56 cm, microcefalia, discreta asimetría facial, mordida asimétrica, cuello alado, implantación amplia, cubitus valgo y nevus dispersos. En 2017 tuvo una IVE por un higroma quístico fetal, y en el embarazo actual en la duodécima semana de gestación se identificaron una TN aumentada y otro higroma quístico, que empeoró y acabó en hidrops fetal, acabando la gestación en aborto. Se toma una muestra de tejido abortivo para la realización de pruebas de diagnóstico genético y se realiza un análisis por PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) para descartar las aneuploidías más frecuentes, que dio como resultado un par sexual XY normal y una dotación cromosómica normal de los cromosomas trece, quince, dieciséis, dieciocho, veintiuno y veintidós. Se procedió tras esta prueba a la realización de una técnica de NGS con un panel de genes relacionado con el hidrops fetal y las rasopatías, este panel se obtuvo de Genomics England PanelApp y estaba compuesto por cincuenta y ocho genes relacionados con el hidrops fetal y veintiún genes relacionados con las rasopatías. En los resultados de este análisis no se encontraron variantes patogénicas ni probablemente patogénicas relacionados con el fenotipo fetal de la paciente.

PACIENTE 3

Mujer de treinta y cuatro años, embarazada, que presentaba antecedentes de dos embarazos consecutivos afectados con patología renal fetal, el primero de ellos presentó una agenesia renal bilateral (IVE a las diecisiete semanas de gestación) en 2017, el segundo también tuvo que terminar en aborto debido a las alteraciones renales fetales, en 2018, y el embarazo en estudio presentó de nuevo un feto con hipoplasia

renal bilateral y anhidramnios, tomando la decisión de realizar una IVE a la semana diecinueve de gestación en marzo del año 2020. Se realizó una ecografía abdominal a los padres, que es normal en ambos casos. Se propuso la toma de muestras fetales del producto de la concepción abortado para la realización de un diagnóstico por secuenciación del exoma dirigido hacia genes causantes de enfermedad renal e hipoplasia o agenesia renal. En los resultados del análisis por WES prenatal dirigido se obtuvo que el feto era portador heterocigoto de una variante patogénica en el gen PAX2, y estas variantes se han demostrado como causa de glomeruloesclerosis focal y segmentaria tipo 7 (HAD), con proteinuria clínicamente significativa con o sin características de síndrome nefrótico, y también como posibles causantes del síndrome papilorenal, que se caracteriza por anomalías oculares y renales. El feto estudiado presentó en el gen PAX2 un cambio en heterocigosis que está clasificado como patogénico tanto en la base de datos de ClinVar como en la base de datos del HGMD. Para valorar si esta variante era heredada o de novo se tomaron muestras de sangre de los padres, y se buscó en ellas la variante patogénica en el gen PAX2 mediante NGS. No se encontró que ninguno de ellos fuera portador, por lo que se asume que la variante patogénica fetal surgió de novo, y eso conlleva por tanto un riesgo mucho menor de recurrencia para la pareja en próximas gestaciones.

PACIENTE 4

Mujer de treinta y cuatro años, con antecedentes familiares de consanguineidad (el abuelo materno de la paciente y el abuelo paterno de su pareja eran hermanos), que acude a la consulta de genética por segunda IVE, con ambos embarazos afectados por un hidrops fetal. El cariotipo del feto afecto en el primer embarazo fue normal (46, XY) y la QF-PCR y el aCGH en el segundo embarazo también han resultado normales. Se propuso la realización de estudio genético mediante WES prenatal dirigido hacia genes correlacionados con el fenotipo fetal, es decir, productores de hidrops fetal. Se analizaron cincuenta y cuatro genes relacionados y se halló una variante patogénica en homocigosis en el gen PIEZO I, de tipo frameshift, causante de una proteína truncada. Esta variante no estaba descrita en bases de datos poblacionales (genomAD) ni tampoco en ClinVar, aunque estas variantes se han asociado, según la literatura, a alteraciones en el sistema linfático e hidrops fetal, por lo que se consideró como altamente probable el ser la causa del fenotipo fetal estudiado. Al completar el estudio genético con muestras de los padres (se hizo una secuenciación en trío) se diagnosticó a ambos como portadores heterocigotos sanos. Se proporcionó consejo genético especializado y se señaló que la variante se hereda de forma autosómica recesiva, y que por tanto el riesgo de recurrencia es de un veinticinco por ciento, por lo que se

aconsejó la realización de técnicas de fecundación in vitro junto a un diagnóstico genético preimplantacional. También se les comunica que se debe estudiar la presencia de esta variante patogénica en la madre de la consultante y la familia paterna de su pareja, para poder posteriormente valorar si está indicado realizar este estudio genético en los hermanos de la paciente y su pareja.

PACIENTE 5

Mujer con antecedentes personales de dos IVE por malformaciones fetales (el primer embarazo presentó un defecto en la pared abdominal y reducción de huesos largos y el segundo un higroma quístico y microcefalia con sospecha de displasia ósea). Actualmente acude por aborto diferido tras encontrar en la ecografía de la semana doce de gestación un higroma quístico, linfedema generalizado y micromelia con CRL de 51 mm, que correspondía a 11+6 semanas de gestación. En el primer embarazo que tuvo, tras la IVE se realizó cariotipo prenatal, con resultado 46, XX (normal) y QF-PCR para cromosomas trece, dieciocho, veintiuno y X, que fueron también normales. Se propone estudio mediante WES en trío (muestras fetales de tejido abortivo y muestras de sangre de los padres), primero estudiando las variantes recurrentes del gen FGFR3, que están asociadas a la acondroplasia (no se detectaron variantes en este gen) y después realizando un WES dirigido a un panel de genes relacionados con las displasias óseas, obtenido de Genomics England PanelApp y compuesto por 407 genes. En este panel se detectaron dos variantes en el gen SLC26A2 que podían ser causantes del fenotipo fetal: la primera variante estaba situada en un dominio transmembrana de la proteína, y estaba ampliamente descrita en la literatura y clasificada en ClinVar como patogénica, siendo de HAR. La segunda variante era de tipo missense y HAR, y no estaba descrita en las bases de datos de la población control ni de los pacientes (ClinVar o GenomAD), pero existen variantes muy próximas a ella que han sido clasificadas como patogénicas. Las variantes patogénicas en el transportador de sulfato de la displasia diastrófica (DTDST) producen un espectro de condrodisplasias de HAR, y en el informe se nombra en orden decreciente de gravedad los procesos designados como acondrogénesis tipo IB, atelostogénesis tipo II, displasia diastrófica, variante de displasia diastrófica y displasia epifisaria múltiple de HAR. La severidad de la variante está relacionada con la actividad residual que quede del transportador de sulfato y con la severidad del fenotipo, y se apunta a que las variantes halladas en el sujeto que se estudia corresponden a variantes missense ubicadas fuera del dominio transmembrana del transportador de sulfato, y esto a menudo se relaciona con una actividad residual que puede “rescatar” el efecto del alelo nulo y así causar fenotipos menos severos. Con la información que

obtuvieron consideraron que las variantes halladas probablemente eran causa del fenotipo fetal, pero para confirmarlo fue necesario estudiar también muestras de los padres, y en este estudio se halló que ambos padres eran portadores heterocigotos sanos de una de las variantes patogénicas en el gen SLC26A2 que provocaba la patología fetal, siendo esta herencia autosómica recesiva el origen de su presentación anómala. Se procedió a comunicar los resultados a los padres y a proporcionarles consejo preconcepcional para evitar recurrencias en la próxima gestación (riesgo de un veinticinco por ciento por cada nuevo embarazo).

PACIENTE 6

Mujer embarazada de dieciséis semanas de gestación, que presenta una ECO de 11+6 semanas normal para la edad gestacional, presentando en la ECO de 12+2 semanas una TN de 4,93 mm, con un índice de riesgo de trisomía veintiuno $> 1/5$ y un índice de riesgo de trisomía dieciocho de $1/31$. Se practicó amniocentesis para estudio genético fetal, encontrándose un cariotipo masculino normal (46, XY) y un análisis de Array CGH normal. Decidieron estudiar la muestra fetal mediante WES dirigido a un panel de rasopatías obtenido desde Genomics England PanelApp, que contiene veintiún genes relacionados con este tipo de patologías. Los resultados de este análisis no esclarecieron ninguna variante patogénica o probablemente patogénica relacionada con el genotipo del paciente. Se realizó una nueva ECO a la semana dieciséis de gestación, y se vio una configuración anatómica fetal aparentemente normal, con genitales masculinos y normalización de la TN. Este caso, junto a algunos otros resultados vistos en la literatura, nos puede hacer pensar que aquellos fetos que presenten una TN aumentada aislada con un cariotipo y un Array CGH normales, probablemente obtengan también resultados normales en las técnicas de NGS, por lo que es posible que no sea una buena opción diagnóstica para estos fetos en concreto.

8.- DISCUSIÓN:

Tras la exposición de los diferentes resultados que hemos obtenido de la revisión bibliográfica sobre el uso de la técnica de WES en la época prenatal, trataremos de interpretarlos y de reflexionar sobre la información que nos aportan. Vemos que dentro de los artículos que hemos revisado existen estudios con cohortes de tamaños bastante variables, pudiendo hacer una diferenciación entre las cohortes más pequeñas (treinta fetos o menos), que corresponden a los estudios de Carss et al. (2014), Ellard et al. (2015), Alamillo et al. (2015), Drury et al. (2015), Pangalos et al. (2016), Yadava &

Ashkinadze (2017), Vora et al. (2017), Chandler et al. (2018), Quilan-Jones (2018), Meier et al. (2019), Koning et al. (2019), Xue (2020) y aquellos estudios que contaron con cohortes de más de treinta fetos: (Yates et al., 2017), Fu et al. (2018), Stals et al. (2018), Daum et al. (2019), el estudio PAGE de Lord et al. (2019), que es el más grande hasta la fecha (610 fetos), Choy et al. (2019), Deden et al. (2020) y Diderich et al. (2020). Lo que podemos comentar sobre este hecho es que probablemente las cohortes de mayor tamaño tendrán más relevancia a nivel estadístico, aunque advertimos que existen también muchos otros factores que debemos tener en cuenta, pues pueden modificar los resultados de estos estudios y provocar sesgos.

Entre estos factores se encuentran algunos de los mencionados previamente, como el uso de análisis mediante tríos, la presencia de anomalías multisistémicas fetales, la selección de los casos por un genetista clínico, la exclusión previa de un diagnóstico mediante pruebas genéticas convencionales, la consanguineidad de los padres, las regiones de homocigosidad en el microarray fetal o la alta probabilidad de presentar un trastorno monogénico. Todos estos factores hacen que el rendimiento diagnóstico mediante WES que se refleja en los resultados de los distintos estudios revisados resulte muy variable, uniendo esto al hecho de que la mayor parte de las cohortes son demasiado pequeñas como para poder ser representativas de la población fetal estudiada.

Señalamos que aquellos estudios que poseen una mayor cantidad de factores que aumentan el rendimiento de la WES prenatal suelen tener una mayor eficacia de esta prueba en sus resultados. El estudio de Yadava & Ashkinadze (2017) es uno de estos ejemplos, ya que logró una eficacia diagnóstica del ochenta por ciento gracias a la selección cuidadosa de los casos y a la introducción de padres consanguíneos, fetos con regiones de homocigosidad en el CMA o con alta probabilidad de padecer un trastorno monogénico. Además, usaron un panel de genes dirigido, lo que disminuyó los hallazgos secundarios y el tiempo de respuesta. Aunque la cohorte de este estudio es muy pequeña (cinco fetos), los resultados que obtuvieron apuntan a que un estudio a mayor escala que utilizara los criterios mencionados conseguiría un rendimiento más elevado que sin tenerlos en cuenta. Otro de los estudios que más rendimiento diagnóstico obtuvo fue el de Chandler et al. (2018), que hizo sobre una cohorte de dieciséis casos fetales un análisis en tríos, seleccionó los casos fetales que fueran compatibles con una displasia esquelética y usó un panel de genes dirigido a estos trastornos, logrando un rendimiento diagnóstico de otro ochenta por ciento en la cohorte estudiada. Este autor refiere en su artículo que las displasias esqueléticas son un grupo amplio de patologías que prenatalmente pueden resultar difíciles de diagnosticar, ya que son muy heterogéneas y la mayor parte de las veces surgen de novo (exceptuando la

acondroplasia y la displasia tanatofórica, que presentan un fenotipo prenatal distintivo y un número limitado de posibles variantes causales). Además, señala que el diagnóstico prenatal de esta enfermedad es necesario para poder desarrollar ensayos clínicos sobre la posibilidad de proporcionar un tratamiento intrauterino para algunas displasias, por ejemplo, utilizando células madre mesocímicas en el útero en la osteogénesis imperfecta tipos III y IV (estudio BOOSTB4). Por otro lado, mencionamos el estudio de Koning et al. (2019), que contó con una tasa de diagnóstico del setenta por ciento usando un análisis en tríos y un panel de genes DDG2P como primera opción, pasando al WES completo si no se hallaban resultados con este. Las tres cohortes mencionadas son pequeñas (30 fetos o menos), y hay que señalar que el estudio con la cohorte más grande hasta el momento (Lord et al., 2019) obtuvo un rendimiento diagnóstico significativamente menor (8,5 por ciento). Esta disminución del rendimiento puede ser debida a la escasez de factores que aumentarían la tasa de diagnóstico que existió en este estudio, ya que los casos no fueron seleccionados por genetistas clínicos, el sesenta por ciento de los fetos incluidos en la cohorte nacieron vivos (tenían menos probabilidades de padecer un trastorno genético), incluyeron fenotipos fetales muy variados, y algunos se asocian a un bajo rendimiento diagnóstico mediante WES (alteración de la TN aislada, defectos del tubo neural, etc) y usaron un panel dirigido a 1628 genes relacionados con trastornos del desarrollo fetal, pero este panel no fue tan específico como los que pueden hacerse si contamos con fenotipos fetales que sugieran enfermedades o síndromes concretos.

A pesar de esta caída del rendimiento en el estudio PAGE, los resultados siguen apoyando que la técnica de WES prenatal cuenta con un elevado potencial para poder identificar alteraciones genéticas imposibles de diagnosticar sin este tipo de tecnología, y que debe seguir optimizándose e investigándose cuál es el procedimiento que se debe seguir para obtener los mejores resultados con la menor cantidad de inconvenientes posible. Además, los beneficios que mencionamos son relevantes y significativos, y a pesar de que existen, de la misma manera, ciertos retos y limitaciones, los autores prevén que estos vayan a minimizarse en un futuro no muy lejano, y que las posibles ventajas tanto económicas, como científicas y médicas van muy pronto a superar con creces a todos aquellos problemas que debamos resolver.

Diderich et al. (2020) llega a plantear en su estudio la idea de sustituir todas las pruebas de WES dirigida por la WES completa prenatal, ya que solo si se detectan las anomalías fetales en el primer trimestre habría tiempo para hacer ambas de forma secuencial y que el resultado pudiera afectar a la decisión reproductiva de los padres sobre el embarazo en curso. Esto no significa que dejemos de usar las pruebas tradicionales de diagnóstico genético, ya que la mayoría de los autores abogan, al menos por el momento, por la

realización de un análisis genético previo tradicional antes de proceder a realizar las pruebas de secuenciación de nueva generación, que estarán más dirigidas a descubrir trastornos monogénicos no visualizables con las pruebas genéticas cotidianas.

También señalamos los importantes avances que ha habido en la terapia molecular fetal, mencionando un estudio realizado por un grupo de John Hopkins (Ghidini et al., 2019) sobre cómo trataron un rabdomioma cardíaco fetal en un feto con esclerosis tuberosa mediante la administración transplacentaria de Sirolimus. Relacionan este tema en este artículo con la WES prenatal, comentando las series de casos que existían sobre el tema y su utilidad especialmente para hallar trastornos monogénicos en fetos con anomalías estructurales. En cuanto a la terapia quirúrgica fetal señalaron especialmente el éxito de la terapia intrauterina de la espina bífida abierta. En otro artículo (The Lancet, 2019), hablan de otros posibles procedimientos quirúrgicos fetales, como la reparación del mielomeningocele o el tratamiento con láser del síndrome de transfusión gemelo a gemelo.

En cuanto a los resultados obtenidos del uso de WES prenatal en el CHUB señalamos que contamos con una cohorte pequeña (seis fetos), pero dado que existen estudios de este pequeño tamaño en la literatura que hemos hallado durante la revisión, hemos decidido exponer también nuestros resultados para aportar más información sobre el tema que nos ocupa. El WES prenatal en el CHUB se hace con varios de los criterios que contribuyen a aumentar el rendimiento de la prueba: los fetos son seleccionados por un genetista clínico, se ha descartado un resultado patológico del cariotipo convencional y del análisis por Array CGH previamente a la realización de la prueba, se utilizan paneles de genes dirigidos al fenotipo fetal observado (obtenidos desde Genomics England PanelApp), se tienen en cuenta los antecedentes personales de los padres y su posible consanguinidad, y, a pesar de que al principio no se realiza el estudio en tríos, si se identifica una variante fetal patogénica, se efectúa inmediatamente después el estudio a los padres para saber si son portadores de la variante encontrada. Se proporciona asesoramiento genético por el genetista clínico previo a la prueba y también una vez que se han obtenido los resultados. Esto es muy importante en los casos en los que se encuentra un trastorno de herencia autosómica recesiva con padres portadores, ya que se debe prevenir a la pareja del riesgo de un veinticinco por ciento de recurrencia en cada uno de los próximos embarazos, y también se proporciona consejo genético preconcepcional antes de la siguiente gestación. En este uso de la WES prenatal en el CHUB se siguen las directrices del ACMG y se utilizan bases de datos sobre genes como ClinVar o genomAD para ayudar a interpretar correctamente los resultados y poder sacar conclusiones adecuadas.

En cuanto a los casos concretos que hemos descrito afirmamos que se encontró una

variable patogénica diagnóstica en 4/6 fetos (66,7 por ciento). Estas variables se encontraron en los genes RYR1, PAX2, PIEZO I y SLC26A2. Había dos variables patológicas del gen RYR1 en el primer feto (una heredada de la madre y la otra del padre), que estuvieron asociadas a un fenotipo fetal con pies zambos, manos en garra, derrame pleural y polihidramnios, y se asociaban a trastornos musculares e hipertermia maligna. La variable del gen PAX2 en el segundo feto se asoció a hipoplasia renal bilateral y anhidramnios, relacionándose con glomeruloesclerosis focal y segmentaria tipo 7 y síndrome papilorenal; las variantes fetales encontradas fueron de HAR. En el tercer feto se halló una variable patológica en homocigosis en el gen PIEZO I (HAR) que provocó un fenotipo fetal de hidrops fetal y que se asocia a alteraciones del sistema linfático. El cuarto feto diagnosticado presentó una variante patológica en el gen SLC26A2, provocando un fenotipo fetal de higroma quístico, linfedema generalizado y micromelia y asociándose a condrodisplasias de HAR. En el feto de la sexta paciente observamos que, presentando una TN aumentada de forma aislada, no se obtuvo un diagnóstico genético mediante WES, y esto coincide con el bajo rendimiento que se observa en otros estudios revisados para estos casos en concreto. Como limitaciones señalamos que no realizamos el WES prenatal en embarazos en curso en los que los resultados de esta prueba pudieran contribuir a tomar la decisión sobre si continuar o no con la gestación, aunque, a pesar de ello, el obtener un diagnóstico genético de la enfermedad fetal y poder saber su patrón de herencia resulta muy útil a los pacientes para poder gestionar sus embarazos futuros, o incluso para realizar pruebas genéticas a familiares que también puedan estar afectados y ser portadores de la mutación. Por los resultados obtenidos podemos intuir que el hecho de enmarcar el fenotipo fetal en un cierto espectro de patología y así realizar la prueba de WES prenatal usando paneles de genes dirigidos a este espectro evita hallazgos inciertos e incidentales, y que, además, como hemos observado en esta pequeña cohorte, sigue aportando una buena tasa de diagnóstico genético a pesar de no secuenciar el exoma completo fetal.

Al igual que la mayor parte de autores que hemos mencionado a lo largo de este trabajo, nosotros, desde el C.H.U.B., también apoyamos el uso de WES prenatal como prueba de diagnóstico genético prenatal complementaria a las tradicionales, siempre que esta se realice de la mano de un genetista clínico especializado, y contando con un asesoramiento genético correcto para los padres.

9.- CONCLUSIÓN:

Como conclusión señalamos la importancia de la secuenciación completa del exoma en el diagnóstico prenatal, y prevemos que el WES cobre una importancia cada vez mayor

a medida que la tecnología siga avanzando, el tiempo de obtención de resultados se acorte, las bases de datos se completen y los costes disminuyan. Creemos que actualmente, para que el rendimiento diagnóstico de esta prueba sea elevado, deben darse una serie de factores que hay que tener en cuenta, como la correcta selección de los casos por un genetista clínico o la realización de la prueba en tríos, y también nombramos tanto los beneficios como las limitaciones que conlleva este análisis. Aunando toda la información que hemos recopilado, los beneficios son mayores que los retos que todavía debemos superar, y concluimos que esta técnica tiene una importancia significativa en el ámbito del diagnóstico prenatal.

10.- BIBLIOGRAFÍA:

1. Alamillo, C. L., Powis, Z., Farwell, K., Shahmirzadi, L., Weltmer, E. C., Turocy, J., Lowe, T., Kobelka, C., Chen, E., Basel, D., Ashkinadze, E., D'Augelli, L., Chao, E., & Tang, S. (2015). Exome sequencing positively identified relevant alterations in more than half of cases with an indication of prenatal ultrasound anomalies. *Prenatal Diagnosis*, 35(11), 1073-1078. <https://doi.org/10.1002/pd.4648>
2. Best, S., Wou, K., Vora, N., Van der Veyver, I. B., Wapner, R., & Chitty, L. S. (2018). Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenatal Diagnosis*, 38(1), 10-19. <https://doi.org/10.1002/pd.5102>
3. Carss, K. J., Hillman, S. C., Parthiban, V., McMullan, D. J., Maher, E. R., Kilby, M. D., & Hurler, M. E. (2014). Exome sequencing improves genetic diagnosis of structural fetal abnormalities revealed by ultrasound. *Human Molecular Genetics*, 23(12), 3269-3277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu038>
4. Chandler, N., Best, S., Hayward, J., Faravelli, F., Mansour, S., Kivuva, E., Tapon, D., Male, A., DeVile, C., & Chitty, L. S. (2018). Rapid prenatal diagnosis using targeted exome sequencing: A cohort study to assess feasibility and potential impact on prenatal counseling and pregnancy management. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 20(11), 1430-1437. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.30>
5. Chitty, L. S., Friedman, J. M., & Langlois, S. (2016). Current controversies in prenatal diagnosis 2: Should a fetal exome be used in the assessment of a dysmorphic or malformed fetus? *Prenatal Diagnosis*, 36(1), 15-19. <https://doi.org/10.1002/pd.4718>
6. Choy, K. W., Wang, H., Shi, M., Chen, J., Yang, Z., Zhang, R., Yan, H., Wang, Y.,

- Chen, S., Chau, M. H. K., Cao, Y., Chan, O. Y. M., Kwok, Y. K., Zhu, Y., Chen, M., Leung, T. Y., & Dong, Z. (2019). Prenatal Diagnosis of Fetuses With Increased Nuchal Translucency by Genome Sequencing Analysis. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00761>
7. Daum, H., Meiner, V., Elpeleg, O., Harel, T., & collaborating authors. (2019). Fetal exome sequencing: Yield and limitations in a tertiary referral center. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 53(1), 80-86. <https://doi.org/10.1002/uog.19168>
 8. de Koning, M. A., Haak, M. C., Adama van Scheltema, P. N., Peeters-Scholte, C. M. P. C. D., Koopmann, T. T., Nibbeling, E. A. R., Aten, E., den Hollander, N. S., Ruivenkamp, C. A. L., Hoffer, M. J. V., & Santen, G. W. E. (2019). From diagnostic yield to clinical impact: A pilot study on the implementation of prenatal exome sequencing in routine care. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 21(10), 2303-2310. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0499-9>
 9. Deden, C., Neveling, K., Zafeiropopoulou, D., Gilissen, C., Pfundt, R., Rinne, T., de Leeuw, N., Faas, B., Gardeitchik, T., Sallevelt, S. C. E. H., Paulussen, A., Stevens, S. J. C., Sikkel, E., Elting, M. W., van Maarle, M. C., Diderich, K. E. M., Corsten-Janssen, N., Lichtenbelt, K. D., Lachmeijer, G., ... van Zelst-Stams, W. A. G. (2020). Rapid whole exome sequencing in pregnancies to identify the underlying genetic cause in fetuses with congenital anomalies detected by ultrasound imaging. *Prenatal Diagnosis*, 40(8), 972-983. <https://doi.org/10.1002/pd.5717>
 10. Diderich, K. E. M., Romijn, K., Joosten, M., Govaerts, L. C. P., Polak, M., Bruggenwirth, H. T., Wilke, M., van Slegtenhorst, M. A., van Bever, Y., Brooks, A. S., Mancini, G. M. S., van de Laar, I. M. B. H., Kromosoeto, J. N. R., Knapen, M. F. C. M., Go, A. T. J. I., Van Opstal, D., Hoefsloot, L. H., Galjaard, R.-J. H., & Srebniak, M. I. (2020). The potential diagnostic yield of whole exome sequencing in pregnancies complicated by fetal ultrasound anomalies. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*. <https://doi.org/10.1111/aogs.14053>
 11. Drury, S., Williams, H., Trump, N., Boustred, C., GOSGene, Lench, N., Scott, R. H., & Chitty, L. S. (2015). Exome sequencing for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic abnormalities. *Prenatal Diagnosis*, 35(10), 1010-1017. <https://doi.org/10.1002/pd.4675>

12. Ellard, S., Kivuva, E., Turnpenny, P., Stals, K., Johnson, M., Xie, W., Caswell, R., & Lango Allen, H. (2015). An exome sequencing strategy to diagnose lethal autosomal recessive disorders. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 23(3), 401-404. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.120>
13. Fu, F., Li, R., Li, Y., Nie, Z.-Q., Lei, T., Wang, D., Yang, X., Han, J., Pan, M., Zhen, L., Ou, Y., Li, J., Li, F.-T., Jing, X., Li, D., & Liao, C. (2018). Whole exome sequencing as a diagnostic adjunct to clinical testing in fetuses with structural abnormalities. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 51(4), 493-502. <https://doi.org/10.1002/uog.18915>
14. Ghidini, A., Bianchi, D. W., Levy, B., Van Mieghem, T., Deprest, J., & Chitty, L. S. (2019). In case you missed it: The prenatal diagnosis editors bring you the most significant advances of 2018. *Prenatal Diagnosis*, 39(2), 61-69. <https://doi.org/10.1002/pd.5407>
15. Hillman, S. C., Willams, D., Carss, K. J., McMullan, D. J., Hurles, M. E., & Kilby, M. D. (2015). Prenatal exome sequencing for fetuses with structural abnormalities: The next step. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 45(1), 4-9. <https://doi.org/10.1002/uog.14653>
16. Jelin, A. C., & Vora, N. (2018). Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 45(1), 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.10.003>
17. Lord, J., McMullan, D. J., Eberhardt, R. Y., Rinck, G., Hamilton, S. J., Quinlan-Jones, E., Prigmore, E., Keelagher, R., Best, S. K., Carey, G. K., Mellis, R., Robart, S., Berry, I. R., Chandler, K. E., Cilliers, D., Cresswell, L., Edwards, S. L., Gardiner, C., Henderson, A., ... Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. (2019). Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): A cohort study. *Lancet (London, England)*, 393(10173), 747-757. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31940-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31940-8)
18. Meier, N., Bruder, E., Lapaire, O., Hoesli, I., Kang, A., Hench, J., Hoeller, S., De Geyter, J., Miny, P., Heinemann, K., Chaoui, R., Tercanli, S., & Filges, I. (2019). Exome sequencing of fetal anomaly syndromes: Novel phenotype–genotype discoveries. *European Journal of Human Genetics*, 27(5), 730-737. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0324-y>

19. Monaghan, K. G., Copenheaver, D., Retterer, K., Scuffins, J., Kucera, C. R., Friedman, B., Richard, G., & Juusola, J. (2017). Whole-exome sequencing on deceased fetuses with ultrasound anomalies: Expanding our knowledge of genetic disease during fetal development. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 19(10), 1171-1178. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.31>
20. Monaghan, K. G., Leach, N. T., Pekarek, D., Prasad, P., Rose, N. C., & ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. (2020). The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: A points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 22(4), 675-680. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0731-7>
21. Mone, F., Quinlan-Jones, E., Ewer, A. K., & Kilby, M. D. (2019). Exome sequencing in the assessment of congenital malformations in the fetus and neonate. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 104(4), F452-F456. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-316352>
22. Pangalos, C., Hagnefelt, B., Lilakos, K., & Konialis, C. (2016). First applications of a targeted exome sequencing approach in fetuses with ultrasound abnormalities reveals an important fraction of cases with associated gene defects. *PeerJ*, 4, e1955. <https://doi.org/10.7717/peerj.1955>
23. Prokop, J. W., May, T., Strong, K., Bilinovich, S. M., Bupp, C., Rajasekaran, S., Worthey, E. A., & Lazar, J. (2018). Genome sequencing in the clinic: The past, present, and future of genomic medicine. *Physiological Genomics*, 50(8), 563-579. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00046.2018>
24. Quinlan-Jones, E., Lord, J., Williams, D., Hamilton, S., Marton, T., Eberhardt, R. Y., Rinck, G., Prigmore, E., Keelagher, R., McMullan, D. J., Maher, E. R., Hurles, M. E., & Kilby, M. D. (2019). Molecular autopsy by trio exome sequencing (ES) and postmortem examination in fetuses and neonates with prenatally identified structural anomalies. *Genetics in Medicine*, 21(5), 1065-1073. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0298-8>
25. Stals, K. L., Wakeling, M., Baptista, J., Caswell, R., Parrish, A., Rankin, J., Tysoe, C., Jones, G., Gunning, A. C., Allen, H. L., Bradley, L., Brady, A. F., Carley, H., Carmichael, J., Castle, B., Cilliers, D., Cox, H., Deshpande, C., Dixit, A., ... Ellard, S. (2018). Diagnosis of lethal or prenatal-onset autosomal recessive disorders by

- parental exome sequencing. *Prenatal Diagnosis*, 38(1), 33-43. <https://doi.org/10.1002/pd.5175>
26. Talkowski, M. E., Ordulu, Z., Pillalamarri, V., Benson, C. B., Blumenthal, I., Connolly, S., Hanscom, C., Hussain, N., Pereira, S., Picker, J., Rosenfeld, J. A., Shaffer, L. G., Wilkins-Haug, L. E., Gusella, J. F., & Morton, C. C. (2012). Clinical Diagnosis by Whole-Genome Sequencing of a Prenatal Sample. *New England Journal of Medicine*, 367(23), 2226-2232. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208594>
27. Talkowski, M. E., & Rehm, H. L. (2019). Introduction of genomics into prenatal diagnostics. *Lancet (London, England)*, 393(10173), 719-721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30193-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30193-X)
28. The Lancet, null. (2019). Fetal medicine: Past, present, and future. *Lancet (London, England)*, 393(10173), 717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30404-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30404-0)
29. Veyver, I. B., & Eng, C. M. (2015). Genome-Wide Sequencing for Prenatal Detection of Fetal Single-Gene Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023077>
30. Vora, N. L., Powell, B., Brandt, A., Strande, N., Hardisty, E., Gilmore, K., Foreman, A. K. M., Wilhelmsen, K., Bizon, C., Reilly, J., Owen, P., Powell, C. M., Skinner, D., Rini, C., Lysterly, A. D., Boggess, K. A., Weck, K., Berg, J. S., & Evans, J. P. (2017). Prenatal exome sequencing in anomalous fetuses: New opportunities and challenges. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 19(11), 1207-1216. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.33>
31. Xue, S., Yan, H., Chen, J., Li, N., Wang, J., Liu, Y., Zhang, H., Li, S., Zhang, W., Chen, D., & Chen, M. (2020). Genetic Examination for Fetuses with Increased Fetal Nuchal Translucency by Genomic Technology. *Cytogenetic and Genome Research*, 160(2), 57-62. <https://doi.org/10.1159/000506095>
32. Yadava, S. M., & Ashkinadze, E. (2017). 125: Whole exome sequencing (WES) in prenatal diagnosis for carefully selected cases. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 216(1), S87-S88. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.029>
33. Yadava, S. M., & Ashkinadze, E. (2019). Whole exome sequencing for prenatal diagnosis in cases with fetal anomalies: Criteria to improve diagnostic yield. *Journal of Genetic Counseling*, 28(2), 251-255. <https://doi.org/10.1002/jgc4.1045>