



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESI DOCTORAL

ESTUDIO DE ARRAY-CGH EN FETOS CON TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA

AUTOR

Edgar Coello Cahua

DIRECTORES

Dra. Nerea Maiz.

Doctora en Medicina i Cirurgia. Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Alberto Plaja

Doctor en Biología. Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. M^a Ángeles Sánchez

Doctora en Medicina i Cirurgia. Universitat Autònoma de Barcelona

TUTOR

Dr. Luis Cabero Roura

Catedrático emérito del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva
Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.**

Barcelona, 2022

Dra. Nerea Maiz.

Doctora en Medicina i Cirurgia. Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Alberto Plaja

Doctor en Biología. Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. M^a Ángeles Sánchez


Doctora en Medicina i Cirurgia . Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la tesis Doctoral “**ESTUDIO DE ARRAY-CGH EN FETOS CON TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA**”, elaborada por Edgar Coello Cahua y dirigida por los abajo firmantes, es apta para ser defendida ante el tribunal correspondiente, para optar al título de Doctor en Pediatría, Obstetricia y Ginecología, otorgado por el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente.



Dra. Nerea Maiz.



Dr. Alberto Plaja



Dra. M^a Ángeles Sánchez



Doctorando, Edgar Coello Cahua

Barcelona, Abril del 2022

A mis padres Edgar y Leova

mi esposa Noemi

y mi hija Isabella

Índice

I. AGRADECIMIENTOS.....	12
II. SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	15
III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	18
IV. ÍNDICE DE TABLAS.....	20
1. INTRODUCCIÓN	22
1.1. MARCO HISTÓRICO.....	23
1.2. LA TRANSLUCENCIA NUCAL.....	24
1.2.1. MEDICIÓN DE LA TN.....	25
1.2.2. TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA.....	27
1.2.2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA TN AUMENTADA.....	29
1.2.2.1.1. ALTERACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	29
1.2.2.1.2. INSUFICIENCIA CARDIACA.....	31
1.2.2.1.3. DEFECTO DE DRENAJE LINFÁTICO.....	32
1.2.2.1.4. INFECCIÓN CONGÉNITA Y ANEMIA FETAL.....	34
1.2.2.2. TN AUMENTADA Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍA.....	34
1.3. ESTUDIOS GENÉTICOS PRENATALES.....	36
1.3.1. VARIANTE DEL NÚMERO DE COPIAS	37
1.3.2. CARIOTIPO.....	38
1.3.3. QUANTITATIVE FLOURESCENT POLIMERASA CHAIN REACTION (QF-PCR).....	39
1.3.4. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION).....	40

1.3.5. MICROARRAY.....	41
1.3.5.1. METODOLOGÍA.....	42
1.3.5.1.1. TIPOS DE ARRAY.....	42
1.3.5.1.2. TIPOS DE DISEÑO DE ARRAY.....	45
1.3.5.1.3. RESOLUCIÓN.....	45
1.3.5.2. INDICACIONES.....	46
1.3.5.3. RESULTADOS.....	47
1.3.5.3.1. TERMINOLOGÍA Y NOMENCLATURA DE LAS CNVS.....	47
1.3.5.3.2. LIMITACIONES DEL ARRAY.....	48
1.3.5.3.3. CLASIFICACIÓN DE CNVS.....	49
1.3.5.3.4. RESULTADOS A INFORMAR.....	53
1.3.5.4. ASESORAMIENTO GENÉTICO.....	55
1.3.5.5. UTILIDAD CLÍNICA DEL ARRAY-CGH EN DIAGNÓSTICO PRENATAL	56
1.3.5.6. UTILIDAD CLÍNICA DEL ARRAY-CGH EN FETOS CON	
TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA.....	58
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	61
3. HIPÓTESIS.....	63
4. OBJETIVOS.....	65
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	66
4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	66
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	68

5.2. APROBACIÓN ÉTICA.....	68
5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	68
5.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	69
5.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	69
5.6. VARIABLES DE ESTUDIO.....	69
5.7. PROTOCOLO CLÍNICO.....	70
5.8. PRUEBA GENÉTICA.....	72
5.9. RECOGIDA DE DATOS.....	74
5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
6. RESULTADOS.....	75
6.1. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	76
6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	76
6.3. DISTRIBUCIÓN SEGÚN PERCENTILES.....	77
6.4. GRUPO DE GESTANTES CON TRANSLUCENCIA NUCAL > P95 HASTA 3,5 MM.....	77
6.5. COMPARACIÓN DEL RESULTADO DE ARRAY EN FUNCIÓN DEL GROSOR DE LA TN	79
6.6. FETOS CON ANOMALÍAS ESTRUCTURALES.....	79
6.7. FETOS SIN ANOMALÍAS ESTRUCTURALES.....	80
6.8. COMPARACIÓN DEL RESULTADO DE ARRAY EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE MALFORMACIONES	80
6.9. VARIANTES DEL NÚMERO DE COPIAS	81
6.10. TEST COMBINADO EN EL GRUPO CON TN ENTRE P95 Y <3,5MM.....	86

6.11. RESULTADO DE LA GESTACIÓN	86
6.11.1 GRUPO DE GESTANTES CON TN > P95 HASTA 3,5 MM	86
6.11.2. GRUPO DE GESTANTES CON TN >3,5MM.....	87
7. DISCUSIÓN.....	88
7.1 HALLAZGOS PRINCIPALES.....	89
7.2 COMPARACIÓN CON LA LITERATURA.....	89
7.3 IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	92
7.4. FORTALEZAS Y LIMITACIONES	93
8. CONCLUSIONES.....	95
9. BIBLIOGRAFÍA	97
10. ANEXOS	111

I. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primeramente a Dios, porque ha permitido cumplir esta meta, llevándola a cabo ante tantas adversidades.

Al Dr Luis Cabero Roura honrarme con formar parte siendo el tutor de tesis y por su confianza y orientación hacia la culminación de la tesis.

A la Dra Mariangeles Sánchez Durán, por su apoyo infinito, su paciencia, su motivación y su empuje, aportando la experiencia, así mismo por la confianza, y todo el tiempo dedicado a lograr la culminación de la tesis.

A la Dra Nerea Maiz Elizaran por su apoyo, y la orientación, su paciencia, por ser pieza fundamental en el desarrollo de la tesis, así como en la publicación del artículo.

Al Dr Plaja porque desde el primer momento mostró interés en el estudio, creyó en el proyecto, y nos aportó todo su conocimiento para el procesamiento de las muestras, por su invaluable aporte en el campo del estudio de arrays, trabajando sin descanso. A todo el personal de la Unidad de genética del Hospital Universitario Vall d Hebrón, porque formaron parte fundamental del desarrollo del estudio.

A la Dra Elena Carreras, por darme la confianza y creer en lo que comenzó en un proyecto y se materializó en este estudio que ha culminado con la redacción de la tesis.

A la Dra María Teresa Higuera, por haberme formado en el campo de la ecografía, despertando la curiosidad y motivando a realizar estudios en el campo de la ecografía, así mismo por mostrarse siempre dispuesta a ayudarme, a aportar toda la información y conocimientos necesarios durante los años del estudio.

A la Dra Ines Calero, por ofrecer su experiencia, mostrarse siempre dispuesta a ayudar, orientar y así mismo enseñarme que las cosas siempre se pueden hacer mejor.

A la Dra Carmen Mediano, por haberme mostrado que a pesar de los años y la experiencia siempre debemos tener la humildad de querer aprender. Por su orientación y por siempre haber estado allí para ayudarme y aclararme los tópicos que me eran desconocidos.

A todo el servicio de Obstetricia del Hospital Universitario Vall d' Hebron, por abrirme las puertas y acogerme durante todos estos años, mostrándome que aún me quedaban muchas cosas por aprender y despertarme el interés por la investigación.

Al servicio de genética del Hospital Universitario Vall d' Hebron por permitirme realizar una pasantía por sus instalaciones acudiendo a sus comités y mostrándome lo interesante de la genética y su importancia en la medicina prenatal.

Al Instituto de Recerca del Hospital Universitario Vall d' Hebron, por primeramente creer en el proyecto y avalar el desarrollo del estudio.

A mi esposa Noemi, que en todo momento fue mi apoyo y mi fuente de motivación a no desfallecer y mantenerme firme en la meta.

A mi hija Isabella, quien con su alegría y genialidad alegraba cada día y me permitía olvidarme de las dificultades.

II. SIGLAS Y ABREVIATURAS

TN	Translucencia nual
CGH	Comparative Genome Hybridization
QF-PCR	Quantitative Flourescent Polimerasa Chain Reaction
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Mm	Milímetros
LCR	Longitud Cráneo Rabadilla
FMF	Fetal Medicine Foundation
MoM	Múltiples de la mediana
NCCLS	National Committee for Clinical and Laboratory Standards
MEC	Matriz extracelular
SOD	Superóxido dismutasa
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
VEGF	Vascular endothelial growth factor
NE	Nuchal Edema
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FOXC	Forkhead transcription factor
Shh	Sonic hedgehog protein
T21	Trisomía 21
T18	Trisomía 18
T13	Trisomía 13
f-hCG	Fracción libre de la gonadotrofina coriónica
PAPP-A	Proteína placentaria A asociada al embarazo
BHCG	Subunidad B de la gonadotropina coriónica humana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Mb	Megabase

MLPA	Multiplex Ligations Probe Amplification
STR	Short tandem repeats
BVC	Biopsia de vellosidad corial
CNVs	Variantes en el número de copias
VOUS	Variantes de significado incierto
BAC	Bacterial artificial chromosome
RCIU/CIR	Restricción del crecimiento intrauterino
ILE	Interrupción legal del embarazo
IVE	Interrupción voluntaria del embarazo
VISLs	Variantes en loci de susceptibilidad
Kb	Kilobase
IQR	Rango intercuartíl
CEIC-VHIR	Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitari Vall d'Hebron
DE	Desviación estándar
p95	Percentil 95
cfDNA	Circulating free DNA
BEMAPRE	Belgian Prenatal MicroArray

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Translucencia nucal.....	24
Figura 2. Medición de la TN.....	26
Figura 3. Correcta colocación de los calipers en la medición de la TN.	27
Figura 4. Matriz extracelular.....	30
Figura 5. Cariotipo.....	38
Figura 6. Quantitative Flourescent Polimerasa Chain Reaction (QF-PCR).....	39
Figura 7. Hibridación in situ fluorescente (FISH) (Fluorescent in situ hybridization).....	38
Figura 8. Array-CGH.....	43
Figura 9. Array-SNP.....	40
Figura 10. Diagrama de flujo que muestra la QF-PCR y los resultados de array en fetos con un grosor de translucencia nucal (TN) entre > percentil 95 y <3,5 mm, y aquellos con NT \geq 3,5 mm, en fetos con y sin anomalías estructurales.....	78

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de TN en percentiles.....	28
Tabla 2. Ejemplos de fórmulas normales y patológicas de array.....	48
Tabla 3. Clasificación y definición de los tipos de CNV	49
Tabla 4. Resultado de array-CGH en fetos con QF-PCR normal en relación con el grosor de la TN y en aquellos con o sin anomalías estructurales asociadas.....	82
Tabla 5. CNV detectadas en fetos con aumento de la TN.....	83
Tabla 6. CNV patogénicas no reportadas detectadas en fetos con TN aumentada...	84
Tabla 7. Variantes de número de copias de significado desconocido (VUS) detectadas en fetos con TN aumentada.....	85

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO HISTÓRICO

La introducción de los estudios genéticos prenatales se remonta a los años 60 del siglo pasado en que se describió la posibilidad de realizar un estudio de cariotipo en el líquido amniótico (1). Desde el inicio, se hizo evidente que los procedimientos invasivos no podían ser una técnica aplicable a toda la población de gestantes tanto por el riesgo de pérdida gestacional inherente a la técnica como por su coste económico. De ahí que se desarrollaran estrategias de cribado que permitieran seleccionar mejor el grupo de gestantes de mayor riesgo de aneuploidía. Inicialmente se estableció la técnica de amniocentesis para gestantes mayores de 35 años, que incluían en aquella época el 5% de embarazadas y en las que se concentraban el 30% de las trisomías 21. Posteriormente, se describieron marcadores bioquímicos, es decir, sustancias (proteínas y hormonas) sintetizadas por la placenta, el feto o ambos en colaboración, que pasan a la circulación materna y cuya concentración puede estar significativamente elevada o disminuida en las gestaciones de fetos con aneuploidías. En segundo trimestre, la utilización de la fracción beta de la gonadotropina (β hCG), junto con la Alfa-fetoproteína y la edad materna, supusieron un incremento en los índices de detección para trisomía 21 hasta el 65% con una tasa de falsos positivos del 5% (2). La descripción posterior de un marcador ecográfico, la Translucencia Nucal (TN), supuso un punto de inflexión importante en el cribado de aneuploidías, ya que por sí sola era capaz de detectar el 75% de los Síndromes de Down, además, en una etapa temprana de la gestación, alrededor de las 12 semanas. Posteriormente, se introdujeron marcadores bioquímicos de primer trimestre, la proteína plasmática asociada a la gestación (PAPP-A) junto con la β hCG, que, combinados con la TN, aumentaron los índices de detección al 85-90%, una estrategia que

sigue vigente en la actualidad (3). En los últimos años se ha implementado un cribado de cromosopatías más avanzado, el estudio de DNA fetal en sangre materna, con un altísimo índice de detección para aneuploidías viables, mayor del 99% para la trisomía 21 y del 97% para las trisomías 18 y 13. Se ha discutido si disponer de este cribado avanzado, podría desplazar en un futuro el cribado combinado de primer trimestre, pero lo que está claro es que la valoración de la TN seguirá teniendo sentido por ser un marcador de patologías diferentes a las aneuploidías comunes (4).

1.2. LA TRANSLUCENCIA NUCAL

La TN es una imagen econegativa que representa un acúmulo de líquido subcutáneo a nivel de la nuca. Puede estar septada o no, y limitarse al cuello o envolver parte del feto. La medición del grosor de la TN se introdujo en los años 90 en la ecografía de primer trimestre de embarazo, como método eficaz de detección de trisomía 21 cuando se combinaba con la edad materna (5). (Figura 1)

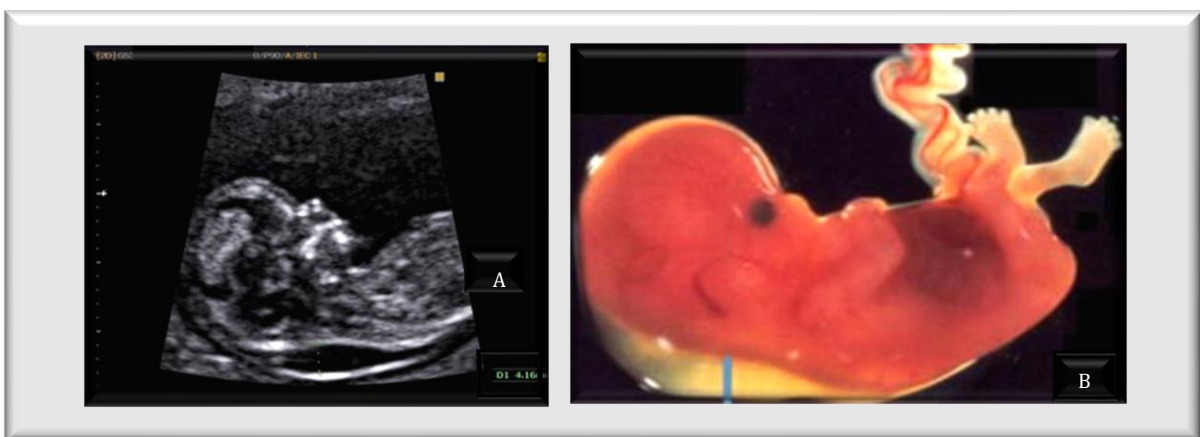


Figura 1. Translucencia nual. A: Imagen ecográfica. B: imagen fetal

1.2.1. MEDICIÓN DE LA TN

Dadas las implicaciones clínicas de una TN patológica, y que, por tanto, las decisiones a tomar a partir de una medida concreta de TN son importantes, es fundamental que todos los ecografistas utilicen la misma metodología. La medición de la TN requiere de una adecuada preparación y formación, para ello la Fetal Medicine Foundation (FMF) publicó los criterios para su correcta valoración y que a día de hoy son utilizados como referencia(5).

La medida debe realizarse entre las 11⁺⁰ y las 13⁺⁶ semanas de gestación, lo que corresponde a una longitud cefalo-nalga (en inglés CRL) entre 45-84mm. Los aspectos técnicos que deben cumplirse son:

- Utilizar un ecógrafo de alta resolución con función de vídeo-loop, y con calipers que permitan medir décimas de milímetros.
- La imagen debe estar ampliada, debiéndose visualizar en la pantalla solo la cabeza y la parte superior del tórax fetal, de manera que cada movimiento del caliper represente un cambio de 0,1mm.
- Debe obtenerse un corte medio sagital del feto adecuado. (figura 2)
- El feto debe estar en una posición neutra de la cabeza. La hiperextensión puede incrementar la medida hasta en 0,6mm y la hiperflexión la puede subestimar hasta en 0,4mm.
- Es necesario evidenciar bien la separación entre la membrana amniótica y la piel.
- Los calipers deben colocarse de forma correcta, entre la piel y el tejido que cubre la columna cervical, asegurándose de medir solo la zona econegativa. (Figura 3)

- Deben tomarse varias mediciones, debiéndose elegir la mayor de ellas.
- En un 5-10% de los casos podría encontrarse el cordón alrededor del cuello lo que podría aumentar falsamente el grosor de la TN. En estos casos debe tomarse la medida por encima y por debajo del cordón en la misma imagen, utilizando la media de ambas.

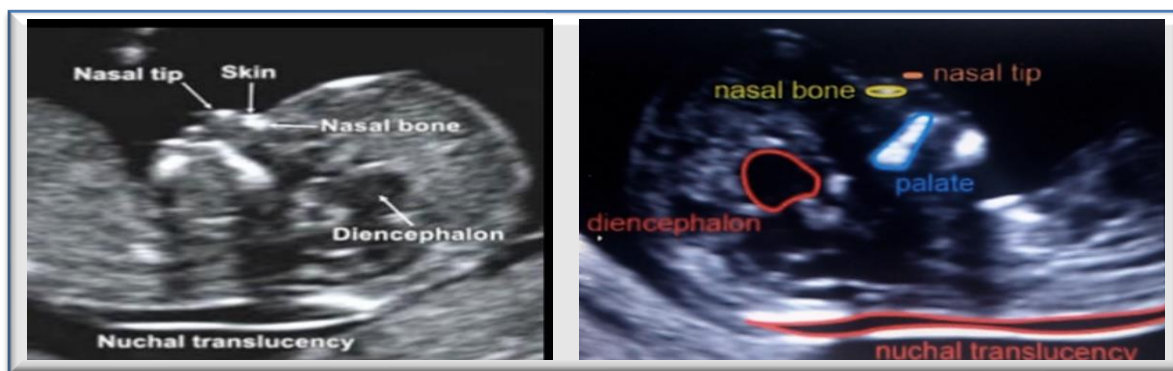


Figura 2. Translucencia nuchal. Imagen ecográfica. Estructuras que deben estar visibles al identificar y medir la translucencia nuchal

La FMF, en el Reino Unido, ha desarrollado un proceso de formación y control de calidad para la implementación adecuada de la TN en la práctica clínica. Dicho proceso está basado en un curso teórico (con instrucciones prácticas acerca de cómo obtener la imagen adecuada y cómo medir correctamente la TN) y la presentación de un álbum de imágenes que deben ser evaluadas y aceptadas para que el ecografista sea certificado. Dicha certificación debe actualizarse cada año.

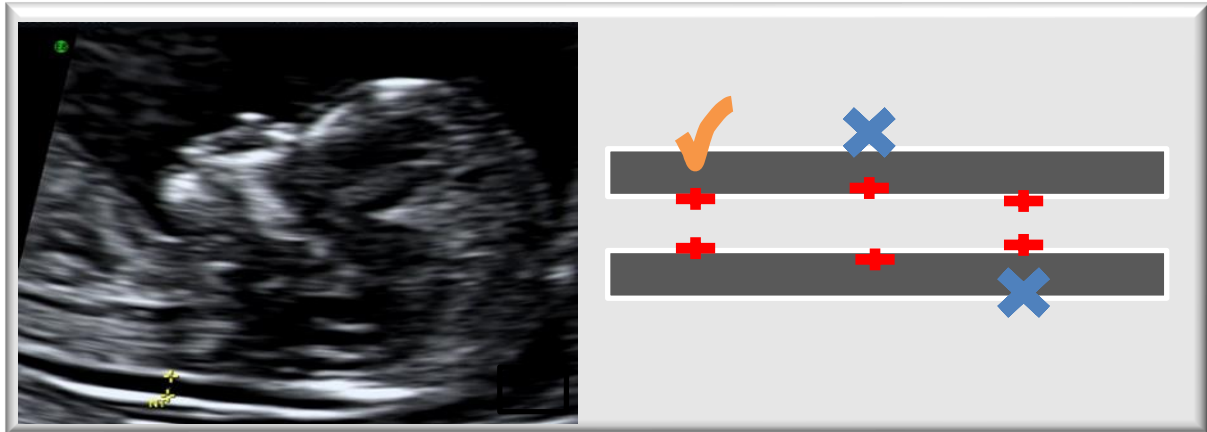


Figura 3. Correcta colocación de los calipers en la medición de la TN.

1.2.2. TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA

Inicialmente se estableció como límite superior de la normalidad para la TN la medida de 3mm, entre las 11⁺⁰ y las 13⁺⁶ semanas de gestación (6). Este único punto de corte fue cuestionado posteriormente ya que la TN aumenta al progresar la edad gestacional (7).

Cuando se propuso modificar el riesgo de trisomía 21 inherente a la edad materna mediante el valor de la TN, no se utilizó el valor absoluto de la TN en milímetros sino su conversión a «múltiplos de la mediana» (MoM). Esta metodología prescinde categorizar la TN como normal o patológica, expresándose en valores de MoM, que por sí solos cuantifican el grado de desviación sobre la normalidad.

En 2006 Borrell *et al* (8) publicaron un estudio siguiendo la misma metodología propuesta para la elaboración de valores de referencia de parámetros de laboratorio del National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) basado en el cálculo de los

percentiles para grupos de medida de CRL establecidos a priori (9). Dicho análisis evidenció como ya sabíamos, que la TN muestra cambios significativos cuando se comparan los resultados por grupos de edad gestacional. (Ver tabla 1)

Tabla 1. Valores de TN en percentiles, en relación con la medida del CRL. Extraído de Borrell *et al* (8).

Tabla 2 Valores de la translucencia nucal correspondientes a los percentiles 1, 2,5, 5, 10, 50 (mediana), 90, 95, 97,5 y 99 para los distintos valores de CRL

CRL (mm)	Percentil								
	1	2,5	5	10	50 (mediana) ^a	90	95	97,5	99
45	0,49	0,58	0,67	0,78	1,18	1,70	1,88	2,05	2,27
46	0,51	0,61	0,70	0,80	1,22	1,74	1,92	2,10	2,32
47	0,53	0,64	0,72	0,83	1,25	1,78	1,97	2,14	2,38
48	0,56	0,66	0,75	0,86	1,28	1,82	2,01	2,19	2,43
49	0,58	0,68	0,77	0,89	1,32	1,86	2,05	2,24	2,47
50	0,60	0,70	0,80	0,91	1,35	1,90	2,09	2,28	2,52
51	0,62	0,73	0,82	0,93	1,38	1,94	2,13	2,32	2,57
52	0,64	0,75	0,84	0,96	1,41	1,97	2,17	2,37	2,61
53	0,66	0,76	0,86	0,98	1,43	2,01	2,21	2,41	2,66
54	0,67	0,78	0,88	1,00	1,46	2,05	2,25	2,45	2,70
55	0,69	0,80	0,90	1,02	1,49	2,08	2,29	2,49	2,75
56	0,70	0,82	0,92	1,04	1,52	2,11	2,33	2,53	2,79
57	0,72	0,84	0,94	1,06	1,54	2,15	2,36	2,57	2,83
58	0,73	0,85	0,96	1,08	1,57	2,18	2,40	2,60	2,87
59	0,75	0,87	0,98	1,10	1,59	2,21	2,43	2,64	2,91
60	0,76	0,88	0,99	1,12	1,61	2,24	2,47	2,68	2,95
61	0,77	0,89	1,00	1,13	1,64	2,28	2,50	2,71	2,99
62	0,79	0,91	1,02	1,15	1,66	2,31	2,53	2,75	3,03
63	0,80	0,92	1,03	1,16	1,68	2,33	2,56	2,78	3,07
64	0,81	0,93	1,05	1,18	1,70	2,36	2,60	2,82	3,11
65	0,82	0,94	1,06	1,19	1,72	2,39	2,63	2,85	3,15
66	0,83	0,96	1,07	1,21	1,74	2,42	2,66	2,89	3,18
67	0,84	0,97	1,08	1,22	1,76	2,45	2,69	2,92	3,22
68	0,85	0,98	1,10	1,24	1,78	2,48	2,72	2,95	3,26
69	0,85	0,99	1,11	1,25	1,80	2,50	2,75	2,98	3,29
70	0,86	1,00	1,12	1,26	1,82	2,53	2,78	3,02	3,33
71	0,87	1,01	1,13	1,27	1,84	2,56	2,81	3,05	3,36
72	0,88	1,02	1,14	1,29	1,86	2,58	2,84	3,08	3,40
73	0,89	1,02	1,15	1,30	1,87	2,61	2,86	3,11	3,43
74	0,89	1,03	1,16	1,31	1,89	2,63	2,89	3,14	3,46
75	0,90	1,04	1,17	1,32	1,91	2,66	2,92	3,17	3,50
76	0,90	1,05	1,18	1,33	1,93	2,68	2,95	3,20	3,53
77	0,91	1,05	1,18	1,34	1,94	2,70	2,97	3,23	3,56
78	0,92	1,06	1,19	1,35	1,96	2,73	3,00	3,26	3,60
79	0,92	1,07	1,20	1,36	1,97	2,75	3,02	3,29	3,69
80	0,92	1,07	1,21	1,37	1,99	2,77	3,05	3,32	3,66
81	0,93	1,08	1,21	1,38	2,00	2,80	3,08	3,34	3,69
82	0,93	1,09	1,22	1,38	2,02	2,82	3,10	3,37	3,72
83	0,94	1,09	1,23	1,39	2,03	2,84	3,13	3,40	3,75
84	0,94	1,10	1,23	1,40	2,05	2,86	3,15	3,43	3,78

CRL: longitud cráneo-caudal.

Finalmente, se ha definido por consenso, que una TN aumentada, es aquella que se encuentra por encima del percentil 95. No obstante, la manera de manejar un embarazo en los casos con TN entre p95-99, puede variar según los grupos. Muchos servicios consideran que una

medida igual o mayor de 3,5mm representa el p99 o más a lo largo de todo el primer trimestre.

La importancia de su detección radica en que puede identificar por sí sola el 75% de las trisomías 21 (10), una alta proporción de otras aneuploidías, asociándose también con defectos cardiacos, y una amplia gama de defectos estructurales y síndromes genéticos.

1.2.2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA TN AUMENTADA

La gran variedad de anomalías asociadas al aumento de la TN sugiere que podría tratarse de un mecanismo multifactorial. A continuación, se revisan los más relevantes.

1.2.2.1.1. ALTERACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Está compuesta por diferentes macromoléculas que pertenecen a las familias de los colágenos, los proteoglicanos y las glicoproteínas no colagenasas, apareciendo también, en algunos tejidos, las elastinas. La más ubicua es la matriz intersticial o estroma, donde las células están embebidas y cuyos componentes mayoritarios son los colágenos que forman fibras, la glicoproteína fibronectina y proteoglicanos del tipo condroitín y dermatán sulfato. Actualmente están identificadas y caracterizadas a nivel molecular 28 subfamilias de colágeno (11). (Figura 4)

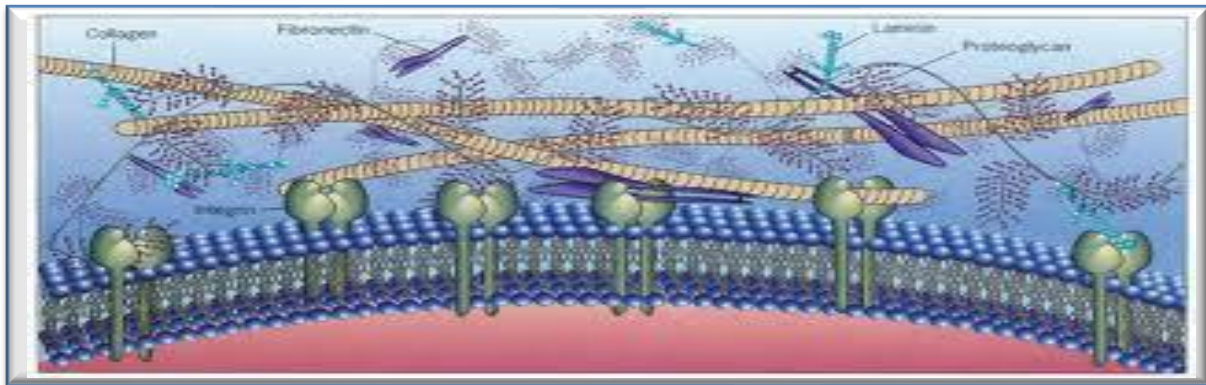


Figura 4. Matriz extracelular. Esquema gráfico de la conformación de la matriz extracelular. Gerald Karp, Biología Celular y Molecular “Conceptos y Experimentos”, 4a edición, Mc Graw Hill, 2005 (12)

Ya en los años 90 se describieron cambios en la matriz extracelular de la piel de fetos con T21 y T18 (13,14). En fetos con trisomías 13, 18 y 21, existe una sobreexpresión de fibrillas insolubles sobre todo del colágeno tipo IV, laminina y colágeno tipo VI, respectivamente, que conduce al aumento del grosor de la TN (14,15), en relación con la sobreexpresión del cromosoma extra. Se sabe que el aumento de la TN en fetos con trisomía 13 se debe a una alteración en la composición del colágeno tipo IV, cuyos genes responsables de las cadenas α -1 y α -2 del colágeno tipo IV, *COL4A1* y *COL4A2*, respectivamente, se encuentran en el cromosoma 13 (13q34) (14). En la piel de la nuca de fetos con trisomía 18 predomina la laminina (relacionado con el colágeno IV), y sabemos que los genes responsables de las cadenas α -1 y α -3 de la laminina *LAMA1* y *LAMA3*, respectivamente, se encuentran en las zonas 18p11.31 y 18q11.2, respectivamente (14). Otros estudios han demostrado una sobreexpresión homogénea de genes que codifican cadenas α -1 y α -2 de colágeno tipo VI y superóxido dismutasa (SOD) en la piel de la nuca de fetos con trisomía 21 (16). Los genes responsables de las cadenas α -2 colágeno tipo VI, *COL6A1* y *COL6A2*, respectivamente, están

ubicadas en la zona 21q22.3, y el gen responsable de SOD, *SOD1* está ubicado en el área 21q22.1. Por otro lado, la matriz extracelular alterada también puede causar un deterioro de la migración celular y por tanto alterar el desarrollo de órganos fetales que reciben contribuciones de la cresta neural como el corazón, el arco aórtico.

En fetos con síndrome de Turner, von Kaisenberg *et al* (16) encontraron que el biglicano estaba subexpresado y los proteoglicanos condroitin-6-sulfato y condroitin-4-sulfato estaban aumentados. El gen responsable del biglicano, *BGN*, se encuentra en la banda Xq28. El biglicano se localiza en el cartílago, la aorta y el compartimento mineral de los huesos. Se ha postulado que el estrechamiento del istmo aórtico en el síndrome de Turner podría ser el resultado de una disminución de BGN o el resultado de la migración anormal de células de la cresta neural, y que el consiguiente aumento de la impedancia de flujo en el arco aórtico conduce a una sobreperfusión de la cabeza y el cuello como causante de la TN aumentada (16).

La alteración de la matriz extracelular también juega un papel importante en la fisiopatología del aumento de la TN en displasias esqueléticas sobre todo en las que tienen defectos de colágeno (5,17).

1.2.2.1.2. INSUFICIENCIA CARDIACA

Diferentes estudios han evidenciado el mayor riesgo de cardiopatía congénita en fetos con TN aumentada, así como el aumento exponencial de este riesgo con el aumento de grosor de

TN (18–21). Sin embargo, el por qué algunos fetos con cardiopatía presentan una TN aumentada, está todavía por definir. Probablemente, la insuficiencia cardíaca (transitoria), ya sea debido a una disfunción miocárdica intrínseca o secundaria a una cardiopatía congénita, podría conducir al acúmulo de líquido que causa el edema de la nuca, sobre todo en una etapa del embarazo en la que una alta proporción del gasto cardíaco normalmente se desvía hacia la cabeza y el cuello (22).

1.2.2.1.3. DEFECTO DE DRENAJE LINFÁTICO

El desarrollo del sistema linfático se inicia a finales de la quinta semana, y es posterior al del sistema cardiovascular.

De la sexta hasta la novena semana las dilataciones locales de los canales linfáticos forman seis sacos linfáticos primarios.

- Dos sacos linfáticos yugulares cerca de la unión de las venas subclavias con las cardinales anteriores (futura vena yugular interna).
- Dos sacos linfáticos ilíacos cerca de la unión de las venas ilíacas con las venas cardinales posteriores.
- Un saco linfático retroperitoneal en la raíz del mesenterio
- Una cisterna de Pecquet dorsal al saco retroperitoneal que comunicará con los sacos yugulares a través de los conductos torácicos derecho e izquierdo

La TN aumentada podría explicarse por una alteración o retraso del desarrollo del sistema de drenaje linfático. El sistema linfático se desarrolla a partir de la pared de las venas, para separarse progresivamente de ellas, excepto en los sacos yuguloaxilares que drenan la linfa de las venas. Un retraso en el desarrollo de las conexiones con el sistema venoso, una dilatación anómala primaria o una proliferación anómala de los conductos linfáticos que interfiera con este drenaje, podrían explicar el aumento de la TN cuando existe dilatación de sacos yugulares. Es bien conocido que en el síndrome de Turner, existe una hipoplasia de los vasos linfáticos (23). Se ha sugerido que el aumento del grosor de la TN fetal en fetos aneuploides puede deberse a una pérdida de la identidad linfática hacia un fenotipo de la pared de los vasos sanguíneos (24).

En general, después de las 14 semanas el sistema linfático fetal se ha desarrollado suficientemente como para drenar cualquier colección de líquido, por lo que la desaparición del incremento de la TN después de esta edad gestacional no debería interpretarse como un hallazgo tranquilizador (25)

1.2.2.1.4. INFECCIÓN CONGÉNITA Y ANEMIA FETAL

El mecanismo por el cual determinadas infecciones pueden cursar con aumento de la TN, suele ser la anemia fetal, y la disfunción miocárdica secundaria. Una TN persistentemente aumentada debe hacer pensar en la posibilidad de una infección a citomegalovirus, toxoplasma o Parvovirus B19. Por ello las anemias congénitas (alfa-talasemia y otras anemias diseritropoyéticas) a través del mismo mecanismo, pueden también cursar con TN aumentada.

1.2.2.2. TN AUMENTADA Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍA

Hace más de 20 años que Nicolaidis describió la asociación entre el aumento del grosor de la translucencia nucal (NT) y el síndrome de Down (26). La translucencia nucal ha demostrado ser un marcador ecográfico útil para la detección de aneuploidías en el primer trimestre (5,10,27,28). El riesgo de aneuploidía aumenta con el grosor de la TN. Souka, halló un 3,7% de anomalías cromosómicas en fetos con TN entre p95 y 3,4mm y más del 21,1% de anomalías para $TN \geq 3,5\text{mm}$ (28). Kagan en 2006 informó de anomalías cromosómicas desde el 7% para fetos con TN entre p95 y 3,4mm hasta el 75% para $TN \geq 8,5\text{mm}$ (29). Así pues, la medida de la TN se utilizó inicialmente como única prueba para el cribado de aneuploidías en el primer trimestre junto con la edad materna, para posteriormente pasar a un cribado combinado ya comentado anteriormente, y que sigue vigente actualmente (30).

En ausencia de aneuploidía, la TN por encima del percentil 99, que se corresponde a una medida ≥ 3.5 mm, se ha asociado con un mayor riesgo de hasta más de 50 entidades genéticas, malformaciones fetales, sobre todo defectos cardíacos, ciertos síndromes genéticos (síndrome de DiGorge, síndrome de Noonan, síndrome de Smith-Lemli-Opitz) y muerte fetal o perinatal (19,28). El riesgo de resultado perinatal adverso global también aumenta con el grosor de la TN (31).

En los últimos años, hemos asistido a dos avances tecnológicos importantes. Uno de ellos es el desarrollo del estudio de DNA fetal en sangre materna que nos ha permitido aumentar los índices de detección de aneuploidías viables, hasta el 99% para la trisomía 21. En el momento actual, esta técnica se aplica de diferentes formas en los programas de cribado, ya sea solo para grupos de alto riesgo o riesgo intermedio, o de forma universal si los recursos sanitarios lo permiten. El otro avance se refiere a la introducción del microarray en el entorno postnatal para luego trasladarlo al entorno prenatal, lo que nos permite detectar ganancias o pérdidas de material genético, con una mayor resolución que el cariotipo convencional.

Varios estudios han evidenciado las ventajas de implementar tecnologías de microarrays en el entorno prenatal. En fetos con anomalías en la ecografía, se detectan variantes del número de Copias (CNV) submicroscópicas patogénicas en aproximadamente el 6-8% de los fetos con malformaciones, especialmente cuando se asocian anomalías cardíacas, esqueléticas, urogenitales y del sistema nervioso central (32–34).

Aunque la mayoría de las anomalías estructurales son susceptibles de detectarse ecográficamente de forma prenatal, una preocupación importante se refiere a los síndromes genéticos que pueden comportar discapacidad intelectual, trastornos psiquiátricos severos y otras características que escapan a la detección prenatal.

Un metaanálisis reciente de 17 estudios realizado por Grande *et al* (35) indicó que el uso de microarrays en fetos con un aumento de TN consigue detectar un 5% adicional de variantes del número de copias submicroscópicas causantes de patología, con respecto a los estudios de cariotipo convencional. Muchos estudios posteriores también han mostrado este mayor rendimiento del array (32,36–43). La variabilidad de resultados en los diferentes estudios puede ser atribuido a los diferentes puntos de corte de la medida de TN utilizada como indicación del estudio de array.

1.3. ESTUDIOS GENÉTICOS PRENATALES

Para poder realizar un estudio genético en un feto, debemos disponer de células nucleadas fetales o que compartan el genotipo fetal.

El tejido de origen fetal más ampliamente utilizado es el líquido amniótico en el que hay células fetales procedentes de varios sistemas (digestivo, respiratorio, urinario y piel). Su inconveniente es que debe obtenerse a partir de las 15 semanas y por tanto es una técnica poco precoz. Su ventaja es la alta fiabilidad ya que se estudian células que en su gran mayoría son solo del feto.

También podemos obtener una muestra de vellosidad corial, que, por tener un origen común con el feto, son genéticamente iguales. La gran ventaja de la biopsia corial es la precocidad, permite realizar estudios entre la 11 y la 14 semana de gestación. Su gran inconveniente, aunque poco frecuente, es que, al no ser un tejido fetal, existe la posibilidad de que el genotipo de la placenta y el feto no sean concordantes y se produzcan falsos positivos

(anomalías confinadas a la placenta y no presentes en el feto) y negativos (anomalías presentes en el feto y no representadas en la placenta).

El inconveniente de este tipo de procedimientos invasivos, es el riesgo inherente de pérdida fetal. No obstante estudios recientes plantean un riesgo muy bajo de aborto, muy inferior al 1% (44,45).

Aunque es poco frecuente, para algunos casos excepcionales también puede obtenerse una muestra de sangre fetal para estudio, mediante cordocentesis, puncionando el cordón en su inserción placentaria, abdominal y mucho menos frecuente en asa libre. Este procedimiento requiere una gran destreza, tiene un mayor riesgo de pérdida fetal, aproximadamente del 1-4% y no puede realizarse de una forma segura antes de las 20 semanas (46).

1.3.1. VARIANTE DEL NÚMERO DE COPIAS

La definición clásica de CNV, adaptada a la resolución de la tecnología disponible en su momento, es un cambio en el número de copias (ganancia o pérdida) de una región del ADN igual o mayor de 1Kb, en comparación con un genoma de referencia. Actualmente, el progreso técnico permite la detección de CNVs de tamaño mucho menor. La gran mayoría de las CNVs son bien toleradas, pero en una minoría de casos su contenido génico es sensible a la dosis y pueden causar enfermedad (47).

Disponemos de diferentes técnicas para detectar una CNV con diferentes sensibilidades y ámbitos de detección. Actualmente las más utilizadas son el estudio de cariotipo, QF-PCR

(Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa y fluorescente), FISH (Hibridación in situ fluorescente), MLPA (Multiplex Ligations Probe Amplification) y array.

1.3.2. CARIOTIPO

El cariotipo consiste en el análisis del número y estructura de todos los cromosomas en metafase, mediante el estudio del patrón de bandas específico para cada cromosoma. Muestra la dotación cromosómica completa en una única prueba y por lo tanto se considera un análisis del genoma completo ("genomewide"). El cariotipo permite la identificación de todas las anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidías autosómicas y sexuales), y las anomalías estructurales con un segmento cromosómico involucrado de tamaño superior a las 5-10 Mb (translocaciones equilibradas, translocaciones desequilibradas, deleciones, duplicaciones, inversiones e inserciones). (Figura 5)

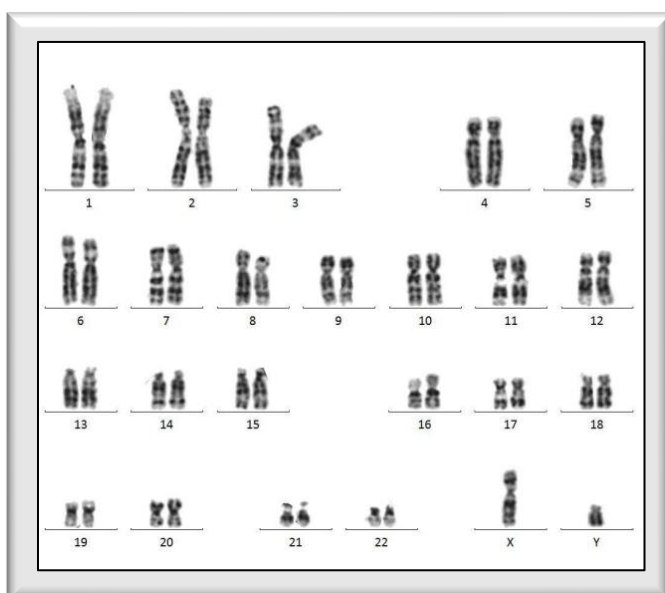


Figura 5. Cariotipo. Cariotipo normal 46XY

1.3.3. QUANTITATIVE FLOURESCENT POLIMERASA CHAIN REACTION (QF-PCR)

La QF-PCR es una técnica molecular basada en la utilización de microsatélites, varias secuencias de ADN polimórficas denominadas repeticiones cortas en tándem ("short tandem repeats", STRs), mediante la cual se pueden estudiar en un mismo experimento un pequeño número de regiones. Generalmente se utiliza para valorar el número de copias de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. El objetivo de la QF-PCR es el diagnóstico rápido de las aneuploidías viables más comunes que son las que implican estos 5 cromosomas (trisomía 13, trisomía 18, trisomía 21 y aneuploidías sexuales). También es capaz de detectar triploidías y algunas tetraploidías y, como toda técnica que analiza marcadores variables del genoma humano, el parentesco entre muestras (por ejemplo, confirmar que una determinada muestra fetal se corresponde a una determinada gestante) y la contaminación materna. Los resultados generalmente están disponibles en 24-48h. (Figura 6)

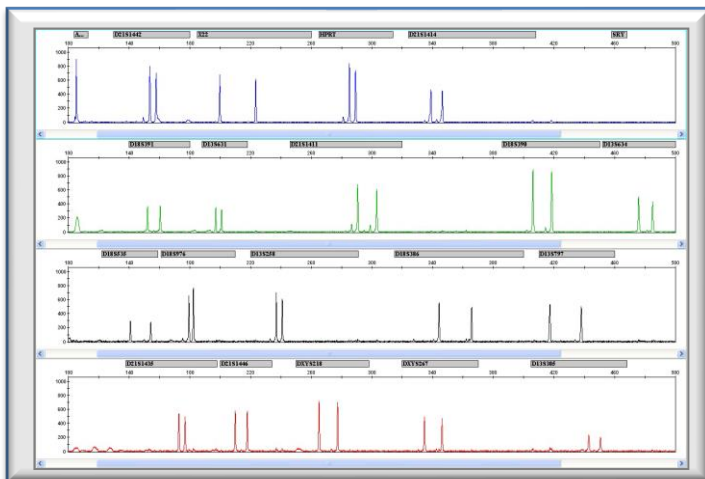


Figura 6. Quantitative Fluorescent Polimerasa Chain Reaction (QF-PCR) QF-PCR Sexo femenino normal

1.3.4. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION)

Es una prueba que en el entorno prenatal se utilizó antes del desarrollo de la QF-PCR para identificar las aneuploidías viables más comunes de una forma rápida, ya que no requiere células en división, además de detectar deleciones y anomalías equilibradas por debajo de la resolución del cariotipo convencional. Detecta y localiza la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas en los cromosomas o núcleos mediante pequeños fragmentos de ADN o sondas marcadas con fluorescencia que se unirán al segmento de cromosoma que buscamos y cuya secuencia es complementaria. Al igual que la QF-PCR, los resultados están disponibles en 24-48 horas, pero se requiere mucha más muestra y mano de obra altamente especializada. El número de regiones analizadas es aún menor que en la QF-PCR (generalmente 2 y en casos excepcionales 3 o 4), lo que con frecuencia obliga a realizar varios estudios en paralelo y tener información previa sobre la anomalía a descartar (ejemplo una deleción 22q11.2). (Figura 7). Actualmente, su uso prenatal es muy limitado, prácticamente restringido a la detección de unos pocos síndromes de microdeleción recurrente como la deleción 22q11.2 o translocaciones crípticas en entornos en que la tecnología de arrays no está disponible.

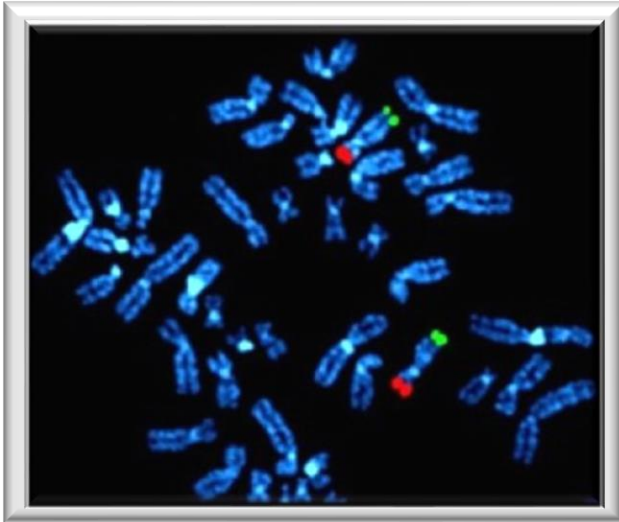


Figura 7. Hibridación in situ fluorescente (FISH) (Fluorescent in situ hybridization)

1.3.5. MICROARRAY

El microarray cromosómico, también llamado cariotipo molecular o simplemente array, es una técnica de detección de ganancias y pérdidas en todo el genoma con una resolución muy superior a la del cariotipo convencional (desde un cromosoma entero a tamaños que en la actualidad tienen una medida de unas 200-300 Kb pero en algunos genes concretos incluso puede ser iguales o superiores a un exón), denominadas “variantes del número de copias” (CNV [copy number variations]). Se basa en la hibridación sobre una matriz sólida con sondas de ADN inmovilizadas que interrogan miles de loci distribuidos a lo largo del genoma (de forma estándar unas 60.000). Su gran ventaja es tener una resolución entre 10 y 1.000 veces superior a la del cariotipo convencional y un tiempo de respuesta más corto, ya que habitualmente puede realizarse en muestras con células sin cultivar. No puede detectar ni

reorganizaciones equilibradas (a diferencia del cariotipo), ni alteraciones de secuencia o mutaciones (al igual que las técnicas de secuenciación como la NGS o el Sanger).

Las CNV pueden causar enfermedad, incluidos trastornos del neurodesarrollo y anomalías congénitas. Ya en el año 2011, se recomendó los estudios de array como prueba de primer nivel, en sustitución del cariotipo, en las evaluaciones postnatales (48), con la excepción de los estudios en pacientes con problemas de infertilidad y de abortos repetidos. La existencia de hallazgos inciertos ha ralentizado su uso prenatal, pero actualmente es la técnica de diagnóstico genético de primera línea en fetos con anomalías estructurales y una opción en los estructuralmente normales (49) . El array ha demostrado claramente ser una herramienta de mayor rendimiento diagnóstico en la evaluación prenatal con respecto al cariotipo.

1.3.5.1. METODOLOGÍA

1.3.5.1.1. TIPOS DE ARRAY

En diagnóstico prenatal se utilizan dos plataformas de microarray, los arrays de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y los arrays de hibridación genómica comparada (CGH). En ambos, el ADN de una muestra fetal (de vello cordial o de líquido amniótico) se hibrida con una plataforma de array, que contiene sondas de ADN en una superficie sólida (50).

El array-CGH compara la muestra a estudiar con una muestra de ADN de referencia normal. Ambos ADN se marcan con fluorescencia de distintos colores, de manera que tras la

hibridación las intensidades son valoradas por programas bioinformáticos. Las duplicaciones tendrán una mayor señal del color de la muestra problema y las deleciones una señal más baja del color de la muestra problema, al comparar con la señal de la muestra de referencia. (figura 8)

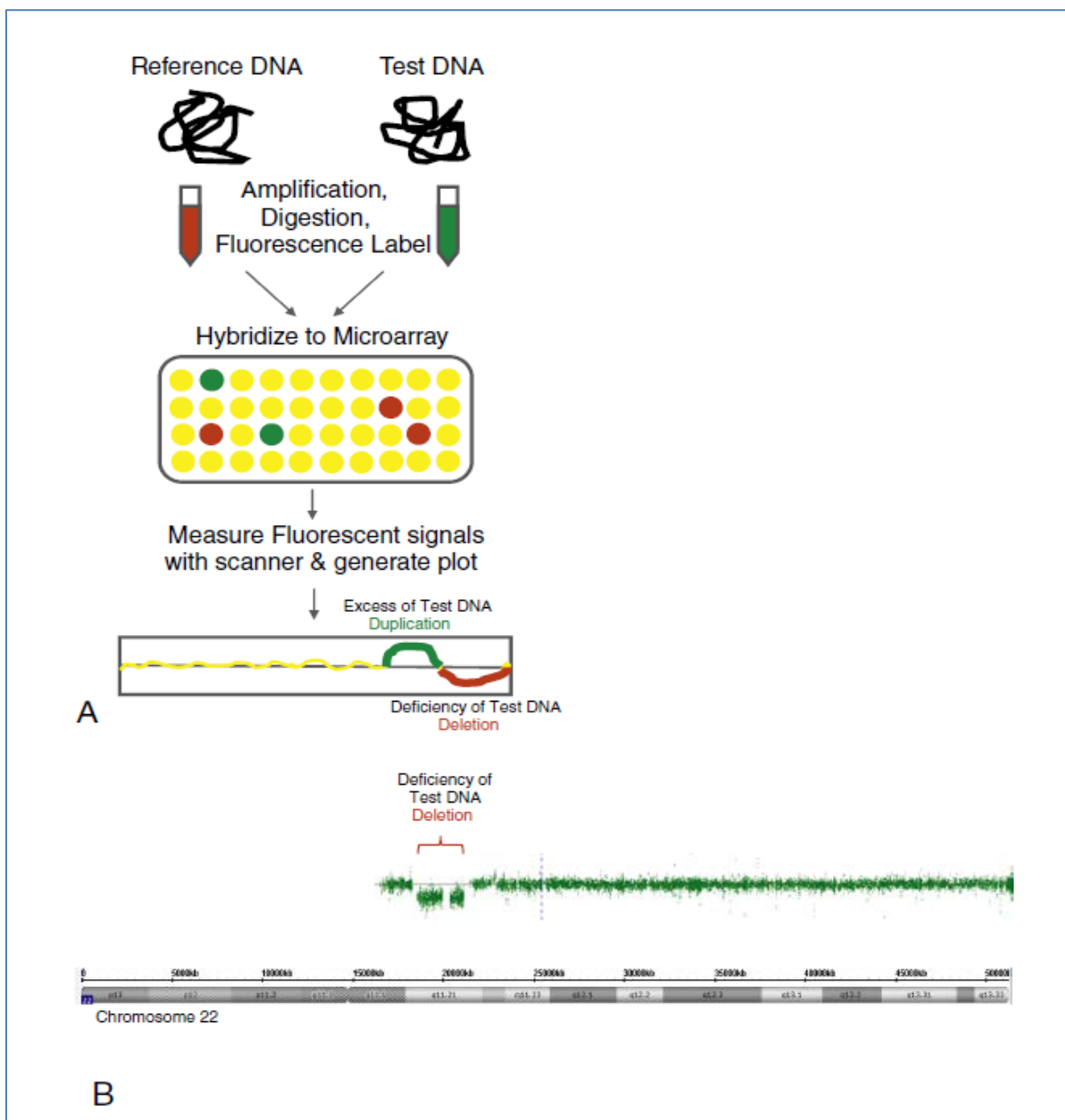


Figura 8: Array-CGH: A: Proceso de array-CGH. B: Imagen real generada en un caso de deleción 22q11.2. En Giordano *et al.* (51)

El array de SNP. Un SNP es una variación en un solo par de bases en una secuencia de ADN entre individuos. Es la forma más común de variación genética. Aquí sólo se hibrida con la matriz, el ADN de la muestra, midiéndose luego igualmente las intensidades de la fluorescencia. A diferencia de la CGH, puede detectar triploidías, algunas (no todas) Disomías Uniparentales o una la presencia de consanguinidad (Figura 9).

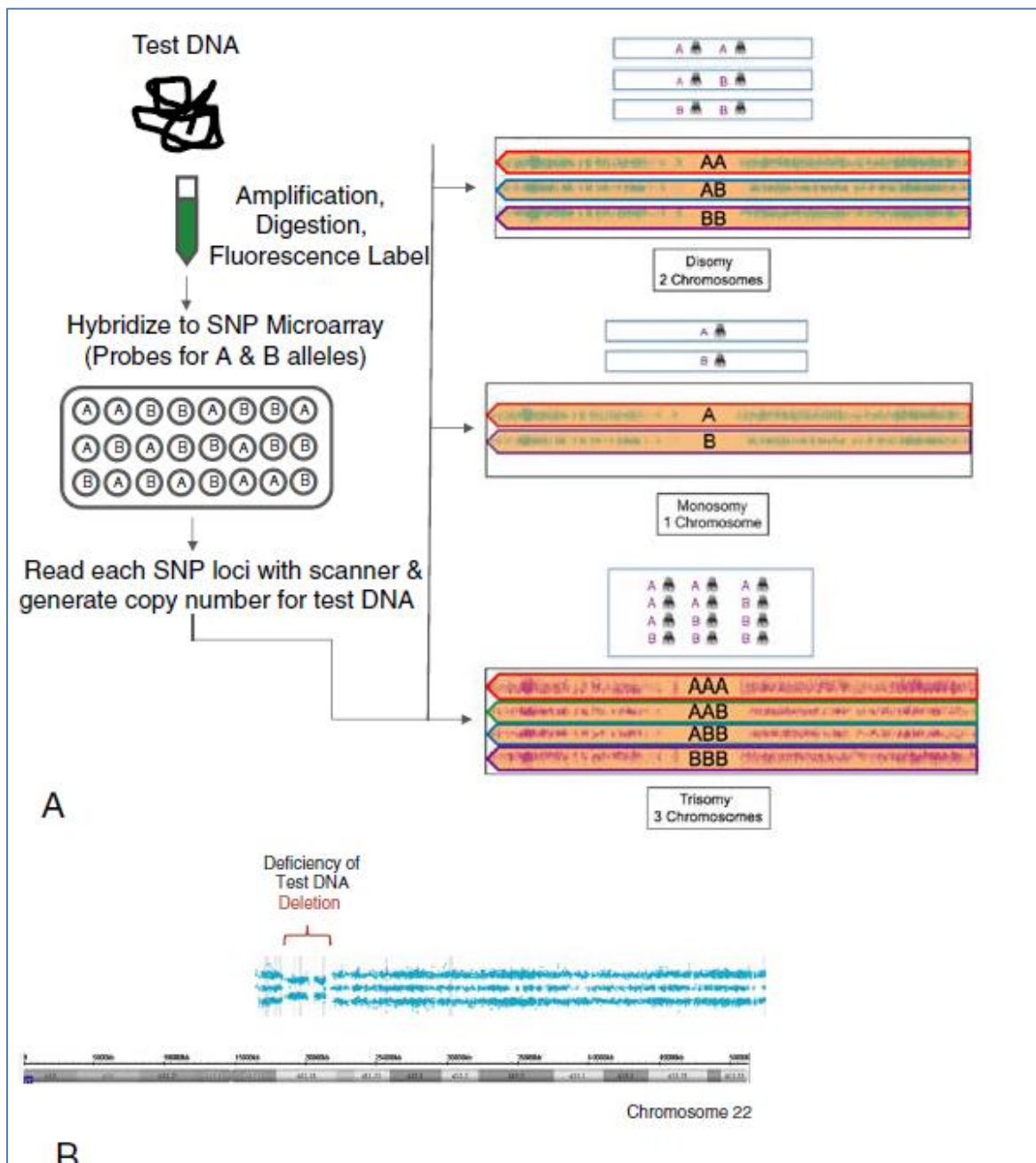


Figura 9: Array-SNP. A: Proceso de array-SNP. B: Imagen real generada de una plataforma de matriz SNP. En Giordano *et al.* (51)

1.3.5.1.2. TIPOS DE DISEÑO DE ARRAY

En función de la disposición de las sondas, existen tres diseños:

- **Microarray dirigido** (targeted). Todas las sondas están dirigidas a regiones implicadas en trastornos conocidos
- **Microarray de genoma completo** (WGA Whole Genome Array). Las sondas se distribuyen uniformemente a lo largo de todo el genoma
- **Microarray mixto**. Se combinan sondas distribuidas por todo el genoma con una separación uniforme, con una mayor densidad de sondas en regiones causantes de trastornos conocidos. Son los más utilizados en diagnóstico prenatal.

1.3.5.1.3. RESOLUCIÓN

La resolución depende del número de sondas, de su tamaño y de su separación, pero actualmente debe ser de al menos unas 400-600 Kb y frecuentemente muy superior en algunas regiones. En diagnóstico prenatal, la alta resolución de los arrays conduce al incremento de hallazgos de significado incierto (VUS, Variant unknow significance), y es por ello por lo que se suelen aplicar determinadas estrategias de filtrado de variantes que obvian este problema (ya sea en el momento del análisis o de la elaboración de los informes) (52).

1.3.5.2. INDICACIONES

En la actualidad son indicaciones bien establecidas de array (53–55):

- La identificación de un defecto congénito mayor o hallazgos ecográficos sugerentes de defectos congénitos menores. En caso de cualquier malformación hay un 6-9% más de rendimiento con respecto al cariotipo (56). En caso de cardiopatía este porcentaje aumenta hasta el 12%.
- La restricción del crecimiento intrauterino (CIR) precoz (<24 semanas) y severo (< percentil 3).
- Translucencia nucal aumentada.
- Presencia de una deleción o duplicación familiar críptica (no detectable por el cariotipo), con riesgo de transmisión y penetrancia significativas, así como de suficiente relevancia clínica para dar opción a la interrupción del embarazo
- Hallazgo de una translocación o inversión «de novo» aparentemente equilibrada o de un cromosoma marcador (especialmente del tipo anillo y marcador no satelizado) en el cariotipo fetal, ya que no son fácilmente identificables por otras técnicas.
- Muerte fetal intrauterina y aborto de segundo trimestre, ya que el microarray tiene más éxito que el cultivo y mayor capacidad de detección que el cariotipo.
- Progenitor portador de reordenamiento cromosómico (translocación parental recíproca o inversión pericéntrica) en equilibrio, para detectar segregaciones desequilibradas potencialmente no visibles por el cariotipo.

- Antecedente en gestación previa de feto con delección o duplicación críptica «de novo», ante la posibilidad de mosaicismo germinal

Existe controversia entre ofrecer array como prueba de primera línea siempre que se plantee un estudio cromosómico fetal o reservarlo solo para casos con anomalías estructurales fetales. Sabemos por el estudio NICHD (56) que la prevalencia de anomalías de array en fetos con cariotipo y ecografía normal es del 1,7%. En otro estudio de Shaffer (33), centrado en gestantes con estudio invasivo por edad materna y cariotipo normal, se detectaron un 0,5% de anomalías de array. Esta prevalencia, plantea la posibilidad de discutir siempre con las gestantes los beneficios y limitaciones del array y el cariotipo cuando se plantea una técnica invasiva.

1.3.5.3. RESULTADOS

1.3.5.3.1. TERMINOLOGÍA Y NOMENCLATURA DE LAS CNVS

El ISCN (“International System for Human Cytogenetic Nomenclature”) es un estándar internacional para la nomenclatura de cromosomas humanos. Incluye la guía para describir la variación estructural detectada por las distintas técnicas genéticas (57). En el caso del array, una CNV se describe con una fórmula que indica la versión de genoma en la que se trabaja, el cromosoma, la banda cromosómica, las coordenadas genómicas (1er y último nucleótido incluido en la anomalía estructural) y el número de copias. Podemos observar ejemplos en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de fórmulas normales y patológicas de array

Fórmula	Interpretación	Descripción
arr(1-22,X)x2 (ISCN 2016) arr(X,1-22)x2 (ISCN 2020)	Mujer normal	Dos copias de los cromosomas 1 a 22 y dos copias del cromosoma X
arr(1-22)x2,(X,Y)x1 (ISCN 2016) arr(X,Y)x1,(1-22)x2 (ISCN 2020)	Hombre normal	Dos copias de los cromosomas 1 a 22 y una copia de los cromosomas X e Y
arr(21)x2~3	Mosaico de células con dos cromosomas 21 y células con tres cromosomas 21.	Se observa un valor intermedio entre el que se observa con dos cromosomas 21 y con tres cromosomas 21)
arr[GRCh37] 17q12(34850785_36248926)x3	Duplicación de la región 17q12	Tres copias de la región 17q12. Numeración según la versión de genoma GRCh37
arr[GRCh36] 16p13.11(14910213_16674911)x1	Deleción de la región 16p13.11	Una sola copia de la región 16p13.11. Numeración según la versión de genoma GRCh36

1.3.5.3.2. LIMITACIONES DEL ARRAY

Esta es una cuestión muy importante a tener en cuenta a la hora del asesoramiento previo a la prueba (50)

- No puede detectar reordenamientos cromosómicos equilibrados, como translocaciones o inversiones.
- No informa sobre el mecanismo cromosómico de un desequilibrio genético. Para saber si una trisomía 13 por ejemplo, es libre o es una translocación Robertsoniana desequilibrada, dato importante para informar del riesgo de recurrencia, necesitamos realizar un cariotipo.
- No detecta el mosaicismo de bajo nivel y (solo los los arrays CGH) no detectan las poliploidias. De todas maneras, se debe recordar que un array CGH habitualmente es precedido por un estudio de QF-PCR para detectar trisomías (tributarias de un estudio de cariotipo), determinar el sexo fetal, detectar poliploidías y descartar una contaminación

materna. El Array de SNP, es capaz de detectar niveles más bajos de mosaicismo, poliploidías y no requiere el conocimiento previo del sexo fetal.

- El array no detectará todas las CNV, como las que están en regiones no representadas en la plataforma de array, ni las CNV muy pequeñas que están por debajo del nivel de resolución.
- Además, el array no detectará mutaciones de secuencia dentro de genes individuales.

1.3.5.3.3. CLASIFICACIÓN DE CNVS

El estudio de array puede informar del hallazgo de una CNV. En función de la repercusión potencial, una CNV puede clasificarse como benigna, patogénica o incierta. De forma similar a la clasificación de variantes de secuencia, en el array se ha pasado también al sistema de cinco niveles tal como se explica en la tabla 3 (58)

Tabla 3. Clasificación y definición de los tipos de CNV

CNV	Definición
CNV patogénica	Presente en pacientes CON fenotipo similar y NO presentes en controles sanos o presentes en controles sanos pero enriquecidas en cohortes de pacientes con fenotipo similar
CNV probablemente patogénica	Evidencia clara de patogenicidad, pero aún no definitiva
CNV probablemente benigna	Sin genes o con genes NO funcionales (pseudogenes, etc)
CNV benigna	Presente en controles sanos y NO enriquecida en cohortes de pacientes
CNV incierta (VUS)	No hay información o la información es insuficiente

CNV patogénica

Incluyen:

- CNV reportadas como asociadas con fenotipos clínicos en múltiples publicaciones revisadas por pares, con penetrancia y expresividad bien documentada, incluso si es incompleta.
- CNV únicas que se superponen completamente con una región establecida sensible a la dosis.
- CNV multigénicas en las que se sabe que al menos un gen es sensible a la dosis,¹¹ incluso si los otros genes tienen o no son sensibles a la dosis o tienen una interpretación incierta.

En ocasiones una CNV patogénica puede ser sólo un factor de predisposición o susceptibilidad para determinadas anomalías fenotípicas probablemente causadas por otros factores (conocidos o no). El concepto de penetrancia se utiliza para cuantificar este hecho. Una penetrancia incompleta significa que existen portadores con fenotipo normal en un porcentaje determinado.

CNV Probablemente patogénica

En general, estas variantes tienen pruebas sólidas que sugieren que causan enfermedad, pero aún no las suficientes como para afirmar definitivamente su patogenicidad.

CNV Probablemente benigna

Existen pruebas que sugieren que probablemente no tienen efectos clínicamente relevantes, pero aún no hay pruebas suficientes para afirmarlo definitivamente. Un ejemplo son las CNVs que no tiene genes en el intervalo genómico afectado.

CNV benigna

Son CNV observadas con frecuencia elevada en controles sanos, que no tienen una mayor frecuencia estadísticamente significativa en pacientes o de las que hay publicaciones que demuestran claramente que carecen de efectos clínicamente relevantes. Importante especificar la dosis de la CNV hallada ya que, en algunas regiones, una duplicación puede ser benigna y la delección puede tener repercusión clínica relevante y viceversa.

CNV de significado incierto

Es una categoría amplia que incluye hallazgos en los que aún no se ha logrado comprobar si tienen un significado patogénico o benigno.

Ejemplos de VUS incluyen:

- Una CNV descrita en un pequeño número de casos en la población general, pero no con una frecuencia insuficiente para demostrar fiablemente si afecta o no al fenotipo.
- Una CNV no descrita que contiene genes que no se sabe si son sensibles a la dosis.

- Una CNV descrita en múltiples publicaciones y / o bases de datos con descripciones contradictorias y, por tanto, sin conclusiones firmes en cuanto a significación clínica

Para clasificar una CNV, es necesario consultar la bibliografía y las bases de datos, sabiendo que en el futuro todo puede cambiar si aparece nueva información relevante.

En general, y de forma práctica, hemos de plantearnos varias cuestiones:

- **Si las coordenadas de la CNV coinciden con una región reconocida como responsable de un síndrome de microdelección/duplicación, la CNV es patogénica.** Un listado con las coordenadas genómicas y las características de algunas de las regiones más conocidas se puede encontrar en <https://decipher.sanger.ac.uk/disorders/syndromes/list>, pero el número real de regiones conocidas es muy superior y por tanto es indispensable una búsqueda bibliográfica exhaustiva.
- **Si la CNV está descrita en un número suficiente de pacientes con fenotipo similar y además no está descrita en sujetos sanos, en función de la evidencia disponible, la CNV es patogénica o probablemente patogénica.** Una de las bases de datos de libre acceso más utilizadas que recopila CNVs en pacientes está mantenida por el consorcio DECIPHER y se puede encontrar en <https://decipher.sanger.ac.uk/browser>.
- **Si se trata de una CNV descrita en sujetos normales y no está enriquecida en cohortes de pacientes, la CNV es benigna.** La Database of Genomic Variants es el recurso más utilizado para comprobar si una CNV está presente en controles sanos y accesible de forma libre y gratuita en http://dgv.tcag.ca/gb2/gbrowse/dgv2_hg19/. Esta base de datos

incluye de una forma normalizada datos obtenidos con diversas tecnologías de una gran cantidad de sujetos considerados sanos.

- **Si la CNV no contiene genes y** no se ha asociado a alguna patología concreta, la consideraremos probablemente benigna
- **Si todas las cuestiones anteriores no nos permiten su clasificación,** la consideraremos como de significado incierto (VUS).

En general todos los laboratorios consultan también sus propias bases de datos, ya que hay CNVs benignas no representadas en las bases de datos internacionales bien porque no son detectables con las herramientas analíticas utilizadas o bien por tratarse de endemismos presentes sólo en algunas poblaciones.

En un intento de reducir las clasificaciones arbitrarias y las diferencias de criterios entre laboratorios, The Clinical Genome Resource (ClinGen) ha desarrollado una calculadora basada en el sistema de puntuación detallado en las guías publicadas por el American College of Medical Genetics que es accesible libremente en <http://cnvcalc.clinicalgenome.org/cnvcalc/>.

1.3.5.3.4. RESULTADOS A INFORMAR

El informe de un array debe contener:

- La descripción de la metodología utilizada, los filtros utilizados y las limitaciones de la técnica

- La descripción de las CNV identificadas tanto patogénicas como probablemente patogénicas
- Existe un consenso cada vez más extendido de no incluir en los informes prenatales los hallazgos benignos e inciertos

En el contexto prenatal, las CNV de significado incierto son un problema muy serio. El acúmulo de información disponible en los últimos años, ha disminuido su prevalencia, pero su manejo en un contexto prenatal sigue generando gran angustia y ningún beneficio. Debido a ello se han diseñado diversas estrategias que tratan de evitar su detección (arrays dirigidos exclusivamente a regiones reconocidas sensibles a dosis o el filtrado informático de los datos obtenidos) o su inclusión en los informes.

La tendencia actual es la detección y evaluación de CNVs en las mismas condiciones que en los estudios postnatales, pero informar solo de los resultados clínicamente relevantes y accionables (resultados que potencialmente pueden permitir emprender alguna medida preventiva o de detección precoz). Las guías disponibles en España no contemplan este tema, pero en 2015 se publicaron unas guías inglesas disponibles en: <https://www.rcpath.org/uploads/assets/06664c28-0f90-4230-86158c91fea14be6/Recommendations-for-the-use-of-chromosome-microarray-in-pregnancy.pdf>. Uno de los principales criterios que contemplan estas guías a la hora de tomar la decisión de reportar una CNV es que tenga una elevada penetrancia, o un valor frecuentemente impreciso o desconocido.

En la misma línea, los belgas han publicado guías, han organizado un comité de consulta permanente y mantienen una base de datos llamada BEMAPRE con centenares de ejemplos

que han ido contemplando y con información sobre su decisión de informar o no. El listado más actual se puede encontrar en la siguiente dirección:http://www.beshg.be/download/guidelines/Table%20S2-List%20of%20prenatal%20cases%20with%20a%20nonbenign%20CNV_version20180926.pdf

1.3.5.4. ASESORAMIENTO GENÉTICO

Se recomienda un asesoramiento previo y posterior al estudio de array realizado por profesionales con experiencia en la comunicación, a veces compleja, de los resultados. En general debe explicarse bien que:

- El array cromosómico es capaz de detectar anomalías que pasarían por alto con un cariotipo porque puede examinar los cromosomas con mayor resolución, pero no detecta alteraciones equilibradas, alteraciones de secuencia o metilación y algunos mosaicismos de bajo grado.
- Pueden identificarse variantes con significado incierto que pueden o no indicar un problema con el feto, que como norma general no serán informados en contexto prenatal
- El análisis de microarray no identificará todos los trastornos genéticos.
- Puede detectar enfermedades de gravedad variable y difícil de predecir.
- Pueden detectarse CNV patogénicas de susceptibilidad o con penetrancia incompleta que implican solo un riesgo de afectación.

- Los resultados de la prueba pueden identificar enfermedades de inicio en la edad adulta. Esto implica que uno de los padres puede tener la misma enfermedad, pero sin haber desarrollado todavía síntomas.

A partir de esta información, se les debe ofrecer a los padres la opción de decidir sobre los resultados que desean conocer y los que no.

1.3.5.5. UTILIDAD CLÍNICA DEL ARRAY-CGH EN DIAGNÓSTICO PRENATAL

El array se ha convertido en la técnica de elección para el estudio de anomalías estructurales detectadas prenatalmente. En fetos con anomalías ecográficas y un cariotipo normal el array puede detectar CNV submicroscópicas clínicamente significativas en el 5-10% de los casos (33,34,56,60–62). Srebniak en 2016 en una cohorte de 1033 fetos con anomalías ecográficas y descartadas trisomías comunes, observaron un 4,3% de anomalías, de las cuales solo un 1,7% eran microscópicamente visibles (62).

De Witt en 2014 en una serie de 3359 fetos con anomalías estructurales, encontraron un 5,6% de anomalías submicroscópicas para anomalías restringidas a un sistema anatómico (desde 3,1% para TN aumentada hasta 4,5% para cardiopatías aisladas) (29). Cuando las anomalías afectaban a más de un órgano, la incidencia de anomalías submicroscópicas ascendió al 9,1% de los casos.

Así pues, parece que el array nos proporciona un incremento adicional diagnóstico en casos de anomalías ecográficas. Los órganos afectados que más se benefician son el sistema nervioso central, cardíaco, musculo-esquelético y gastrointestinal.

En el caso de anomalías cardíacas, en el metaanálisis de Jansen de 2015, el array produjo información adicional clínicamente valiosa con respecto al cariotipo en el 7% de los casos (3,4% vs 9,3% para cardiopatías aisladas vs sindrómicas) (63).

Para anomalías de SNC, son la hipoplasia cerebelosa y la holoprosencefalia las que más se benefician del estudio de array (33,64).

En el caso de la restricción del crecimiento intrauterino, un estudio de de Witt del 2014 en fetos con cariotipo normal, identificó anomalías de array en el 1,3% para CIR aislado y del 5,7% cuando se asociaba a anomalías de líquido amniótico o marcadores blandos (34).

Respecto al rendimiento del array en contexto prenatal cuando no hay anomalías ecográficas, varios estudios han mostrado recientemente, anomalías submicroscópicas patogénicas en el 0,5-1% de gestantes con procedimiento invasivo por edad materna, cribado de alto riesgo o ansiedad materna (56,65–70). Wapner en 2012, en una cohorte de gestantes con procedimiento invasivo por edad o cribado de alto riesgo, identificó un 1,7% de CNV patogénicas (56). Por ello se ha sugerido que el array se convierta en la prueba de elección para todas las mujeres sometidas a procedimientos invasivos. Una crítica a este planteamiento es la posibilidad de detección de VUS o hallazgos incidentales, y es este motivo por el que es tan importante el asesoramiento genético previo.

1.3.5.6. UTILIDAD CLÍNICA DEL ARRAY-CGH EN FETOS CON TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA

Como ya se ha comentado, el aumento de la TN se asocia con un alto riesgo de anomalías cromosómicas, defectos fetales importantes y una amplia gama de síndromes genéticos (28,71). También se asocia con un mayor riesgo de aborto espontáneo, muerte fetal o anomalías del desarrollo neurológico (72). Un número importante de síndromes genéticos son causados por CNV, con frecuencia por debajo de la resolución media del cariotipo de 5-10 Mb y a menudo no detectables en la ecografía del primer trimestre (56).

Un metanálisis realizado en fetos con aumento de TN aislada mostró que el array podía detectar aproximadamente en un 4% CNV patogénicas no visibles por cariotipo (35). La variedad de resultados en los diferentes estudios puede explicarse por los diferentes puntos de corte de TN utilizados y también por los diferentes tipos y diseño del array empleado. Además, algunos estudios incluyeron pocos casos e incluso TN aumentadas no aisladas. La clasificación de las CNV es muy heterogénea en los estudios, incluso discutible.

En general, la investigación del valor del array en fetos con TN aumentada se ha centrado en un valor de corte fijo de TN de más de 3.5 mm (32,35,42,43,55), y menos estudios han informado sobre la importancia clínica de la TN entre 2.5 y 3.4 mm, que en general corresponde a los percentiles entre p95-p99. La Asociación Americana de Obstetricia y Ginecología desde el año 2020 recomienda el estudio de array para TN por encima de 3mm (73).

Maya *et al.* en 2017 establecieron tres grupos de estudio, TN <2,9mm, TN entre 3 y 3,4mm y TN mayor o igual de 3,5mm. Encontraron una tasa de CNV clínicamente significativas solo detectadas por array del 0,9%, 1,8% y 2,2% respectivamente en cada grupo (37). Zhao *et al.* en 2019 con un grupo de 319 TN aumentadas, hallaron un 4,2% de CNV patogénicas en el grupo de fetos con TN >3mm aislada y cariotipo normal, y un 5,12% en el grupo de TN con alguna anomalía ecográfica hallada en cualquier trimestre (38). Su *et al.* en 2019 estudiaron 192 fetos diferenciando TN entre 2,5-3,4mm y por encima de 3,5mm. En el grupo de TN menor, hallaron un 1,6% de CNV clínicamente significativas y en el grupo de mayor TN la incidencia fue del 5,5%. Aunque las diferencias no fueron significativas, el array mejoró el rendimiento diagnóstico con respecto al cariotipo también en el grupo de TN <3,5mm (34). Xue *et al.* en 2020 en un grupo de 503 gestantes con TN aumentada, identificaron en el grupo entre p95 y 3,5mm un 2,6% de CNV submicroscópicas patogénicas con un 3,5% añadido de VUS. Sin embargo por encima de 3,5mm, la tasa de CNV submicroscópicas patogénicas fue del 4,23% con un 1,15% de VUS (40).

Bardi *et al.* en 2019 que estudiaron 1901 fetos pusieron de manifiesto una prevalencia de aneuploidias o anomalías solo visibles en cariotipo del 14% en el grupo de TN entre p95-99 y del 43% en el grupo con TN>p99. La incidencia de trastornos submicroscópicos o anomalías de un solo gen, en el grupo de TN entre p95-p99 fue de 0,9% y 0,6% respectivamente y para el grupo con TN> fue del 3% y 3,3% respectivamente (74).

Sagi-Dain *et al.* en 2020 estudiaron un total de 619 fetos con TN entre 3-3,4mm hallando con el estudio de array una CNV en el 1,45% de los casos, (75). Petersen *et al.* en 2020, estudiaron 211 fetos con TN entre 3-3,4mm con cribado de alto riesgo, encontrando una tasa de CNV submicroscópicas < 10Mb del 1,89%. Realizaron un metaanálisis con datos previos de

Grossman (76), Maya y Zhao que analizan también el mismo grupo de TN entre 3-3,4mm, y concluye que el riesgo residual de una aberración cromosómica distinta de las trisomías comunes en un feto con NT 3.0-3.4 mm era de 1:21 para todas las aberraciones incluidas, 4.8% o 1:33 excluyendo las CNV de susceptibilidad 3,0% (41).

Hui *et al.* en 2021 estudiaron 81.244 fetos, y los dividieron en tres grupos, TN $\geq 3,5$ mm (491 casos), TN entre 3-3,4mm (531casos) y TN <3 mm (los restantes 80.219). La frecuencia de una anomalía cromosómica atípica (diferente de las aneuploidias comunes, 21,18,13 y cromosomas sexuales) fue del 4,07 %, del 0,37 % y del 0,09 % en los grupos con una TN de 3,5 mm, 3,0-3,4 mm y $<3,0$ mm, respectivamente (77).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las gestaciones con aumento de la TN detectada en primer trimestre siguen siendo un desafío para el obstetra, tanto en cuanto al asesoramiento de la pareja como a su manejo. Existen en la literatura diferentes trabajos que muestran las ventajas de implementar el estudio de array en el entorno prenatal para evaluar fetos con anomalías estructurales (32,34,56,60,78). Respecto a la TN aumentada, un metaanálisis (35) mostró que el array puede detectar un 4% más de anomalías con respecto al cariotipo en estos fetos y los resultados de otros estudios posteriores van en la misma línea. Como se ha señalado previamente, la variedad de resultados en los diferentes estudios podría explicarse por los diferentes puntos de corte utilizados y los distintos tipos de array aplicados.

Existe una clara indicación de estudio de array para fetos con una TN >p99, que corresponde a 3,5mm para cualquier edad gestacional, pero no está bien establecido si esta indicación debe ampliarse para translucencias nucales por debajo de este punto de corte. Algunas Sociedades científicas como la americana, recomiendan ya bajar este punto de corte a 3mm (73).

La necesidad de conocer de forma fiable el rendimiento de la técnica de array que sustente su utilización, ayude al asesoramiento de la pareja y permita establecer puntos de corte de medida de TN efectivos, nos ha llevado a diseñar este estudio basado en utilizando una cohorte homogénea y perfectamente caracterizada de fetos con TN aumentada,

3. HIPÓTESIS

El estudio de Array incrementa la tasa de detección de anomalías cromosómicas con respecto al cariotipo convencional en fetos con translucencia nucal aumentada.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal es estudiar el rendimiento de las pruebas de array analizando todas las CNV detectadas, notificadas o no, en fetos con translucencia nucal aumentada.

4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

4.2.1. Analizar el tipo de CNVs identificadas por array en relación con el grosor de la TN por debajo o por encima de 3,5mm.

4.2.2. Analizar si existe alguna correlación entre los hallazgos de CNVs en relación con la presencia o ausencia de anomalías estructurales fetales asociadas.

4.2.3. Analizar si existe una mayor prevalencia de determinadas CNVs recurrentes en fetos con translucencia nucal aumentada

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio observacional retrospectivo de cohorte única se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico Prenatal en colaboración con el Área de Genética Clínica y Molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebrón de Barcelona entre enero de 2015 y diciembre de 2018.

5.2. APROBACIÓN ÉTICA

El estudio fue aprobado por el comité institucional de ética en investigación (CEIC-VHIR) el 22 de noviembre del 2019, PR(AMI)408/2019. (ver anexo 1)

5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio fueron las gestantes que acudieron a la Unidad de Diagnóstico Prenatal del Hospital durante el periodo indicado (2015-2018), por presentar una TN mayor al percentil 95 en el primer trimestre.

5.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Gestantes entre las 11 y 13⁺⁶ semanas
- Fetos con TN mayor al percentil 95
- Gestantes mayores de 18 años
- Gestantes con capacidad de comprender y firmar el consentimiento informado

5.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Gestantes que renunciaron al procedimiento invasivo
- Gestantes en las que no se realizó array CGH

5.6. VARIABLES DE ESTUDIO

- *Variables demográficas:* edad materna, paridad (antecedente de partos a término, pretérmino, abortos y nacidos vivos).
- *Variables ecográficas:* Semanas de gestación, tipo de gestación (única o múltiple), corionicidad en caso de gestación múltiple, medida de longitud cráneo caudal (CRL), medida de Translucencia Nucal, estudio morfológico fetal a las 16 semanas, estudio morfológico fetal a las 20 semanas, sexo fetal.

La TN se clasificó como normal (<percentil 95), entre percentil 95 y 3,49 mm, o $\geq 3,5$ mm.

- *Variables del estudio genético (en vellosidad corial o en líquido amniótico):* resultado de la QF-PCR, del cariotipo convencional y del estudio de microarray.

El resultado de la QF-PCR se clasificó como normal o anormal, si se detectaban aneuploidías.

El resultado del cariotipo se clasificó como normal o anormal, si se detectaba alguna anomalía estructural o numérica.

El resultado del array-CGH se clasificó como normal o CNV, y estas se clasificaron como CNV patogénica, CNV patogénica no reportada, CNV autosómica recesiva y VUS.

- *Variables postnatales:* edad gestacional en el momento del parto, motivo de la finalización de la gestación, peso neonatal (en gramos), Apgar al nacimiento, exploración clínica al nacimiento.

5.7. PROTOCOLO CLÍNICO

La medición de la TN siguió el protocolo de la Fetal Medicine Foundation (10). El protocolo de cribado de aneuploidías del primer trimestre de nuestro centro sigue las recomendaciones del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya detalladas en el “Protocol de Seguiment de l’embaràs a Catalunya” en su apartado “Cribratge prenatal d’anomalíes cromosòmiques”. Este protocolo establece un cribado combinado (11,12) obteniendo una

muestra de suero para la medición de la PAPP-A y β HCG entre las 8 y 13⁺⁶ semanas y una ecografía para la medición de la longitud cráneo-caudal (CRL) y la TN, entre las 11⁺⁰ y 13⁺⁶ semanas. Dado que es un protocolo regional, todos los centros, tanto en ámbito público como privado, siguen la misma pauta.

A todas las mujeres cuyos fetos tenían un espesor de TN superior al percentil 99, que coincide con 3,5 mm (13), se les ofreció una prueba invasiva. En aquellos embarazos en los que el feto tenía una TN > p95 pero <3,5 mm, la recomendación y la decisión de una prueba invasiva estaba influida por el resultado del riesgo combinado y la percepción de riesgo por parte de la pareja.

Todas las mujeres fueron derivadas a la unidad de diagnóstico prenatal para su asesoramiento respecto a las implicaciones y manejo de la TN aumentada. El asesoramiento previo a la prueba invasiva incluyó información sobre los riesgos relacionados con el procedimiento y sobre las técnicas de diagnóstico a aplicar. Se explicó a las mujeres que no se les informaría sobre CNV benignas ni VUS. Se les preguntaba también si deseaban conocer hallazgos sobre variantes patogénicas de baja penetrancia y variantes patogénicas relacionadas con enfermedades mendelianas con una baja frecuencia de portadores.

Dependiendo de la indicación y la edad gestacional, el análisis genético se realizó en muestra de vellosidades coriónicas o líquido amniótico. En todas las muestras se aplicó la técnica de QF-PCR como prueba diagnóstica de primera línea para la evaluación rápida de las aneuploidias cromosómicas más frecuentes, incluidos los cromosomas 21, 18, 13 y los cromosomas sexuales.

En el periodo 2015-2016 se realizó QF-PCR y cariotipo en todas las muestras, y un array-CGH solo en aquellos casos con cariotipo normal. A partir de 2017, el cariotipo solo se realizó en aquellos casos de aneuploidía detectada por QF-PCR, con el objetivo de descartar translocaciones, realizando array-CGH en el resto de los casos. Finalmente, el cariotipo se realizó en una minoría de casos para permitir una caracterización completa de los hallazgos específicos del array. Se extrajo ADN tanto de células cultivadas como no cultivadas y, una vez realizados los estudios solicitados, los remanentes se almacenaron por si fueran necesarios estudios genéticos adicionales.

Se realizó siempre un estudio morfológico y ecocardiográfico precoz a las 16 semanas y una ecografía morfológica a las 20 semanas.

5.8. PRUEBA GENÉTICA

De ser posible, se establecieron al menos dos cultivos celulares independientes de acuerdo con procedimientos estándar (79) como respaldo en caso de problemas técnicos con muestras frescas y para permitir el análisis de cariotipo si fuera necesario. La muestra restante se utilizó para la extracción de ADN genómico.

El ADN para QF-PCR se extrajo mediante un procedimiento a base de resina (Instagene Matrix; Bio-Rad Laboratories, EEUU) (80), excepto para las muestras de vellosidades coriónicas no cultivadas en las que se realizó con el ADN extraído para la técnica array-CGH (ver más abajo). El ADN de muestras no cultivadas o cultivadas de líquido amniótico y biopsias de corion para

la técnica array-CGH, se extrajo con el Kit de extracción de ADN genómico iGENatal™ (igenBiotech, Madrid) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

La QF-PCR se realizó con los kits de QF-PCR Devyser Complete (Devyser, Suecia) o Aneufast (Genomed AG, Suiza) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. De acuerdo con los procedimientos estándar, si la QF-PCR detectó alguna aneuploidía, se realizó un análisis citogenético convencional de 20 células de líquido amniótico cultivadas de dos líneas independientes utilizando bandas G (79) para confirmar los resultados y descartar alteraciones estructurales. De lo contrario, el ADN fetal se analizó con ensayos de hibridación genómica comparada CytoSure Constitutional 8 × 60K v3 (ogt, Reino Unido) o qChip® Pre 8x 60K (qgenomics, España) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Las CNV se clasificaron de acuerdo con las normas y directrices del American College of Medical Genetics para la interpretación y notificación de las CNV constitucionales posnatales, y se informaron siguiendo las recomendaciones internacionales (58,81,82). En definitiva, no se informaron variantes recesivas raras no relacionadas con anomalías fenotípicas fetales y CNV clasificadas como benignas, de significado incierto y de baja penetrancia, salvo en los casos en que la pareja sí deseaba conocer las CNV recesivas o de baja penetrancia.

Todas las variantes, informadas o no a los progenitores, se incluyeron en nuestro análisis, excepto las CNV benignas o VUS menores de 400 kb.

Los resultados se dieron en una consulta específica de asesoramiento genético posterior a la prueba, explicando los hallazgos y sus implicaciones más relevantes, para apoyar la toma de decisiones informada.

5.9. RECOGIDA DE DATOS

Todos los datos fueron registrados pseudo-anonimizados en una base de datos electrónica creada específicamente para el estudio.

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis descriptivo, los datos continuos se describieron como media y desviación estándar (DE). Las variables categóricas se informaron como número absoluto y porcentaje. Los intervalos de confianza (IC) del 95% para las proporciones se estimaron mediante la prueba de proporción de una muestra con la corrección de continuidad de Yate.

La comparación de los resultados de array entre ambos grupos de TN se realizó mediante test de Fisher.

Para el análisis se utilizó el software estadístico R (versión 3.6.0).

6. RESULTADOS

6.1. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

Durante el período de estudio, fueron remitidas a la Unidad de Diagnóstico Prenatal un total de 296 gestantes cuyos fetos tenían una TN superior percentil 95.

Cincuenta y siete (19,3%) gestantes rechazaron un procedimiento invasivo. De los 239 casos en los que se realizó una prueba genética (192 muestras de vellosidad corial y 47 amniocentesis), 46 tuvieron una QF-PCR anormal y en 31 casos no se realizó un estudio de array, y, por lo tanto, todos ellos fueron excluidos del análisis, (figura 10).

6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

La edad materna media fue de 31,2 años (DE, 5,4) y la media de la medida del CRL fue de 61,9 mm (DE, 8,3).

Ciento cincuenta y cinco embarazos eran únicos (95,6%) y 7 (4,3%) fueron embarazos gemelares bicoriales biamnióticos. En todas las gestaciones múltiples, solo uno de los fetos presentó una TN aumentada.

6.3. DISTRIBUCIÓN SEGÚN PERCENTILES

De los 162 casos con una QF-PCR normal, 128 (79,0%) tenían un grosor de TN <3,5mm y 34 (21,0%) tenían una medida de TN ≥3,5mm.

6.4. GRUPO DE GESTANTES CON TRANSLUCENCIA NUCAL > P95 HASTA 3,5 MM

En este grupo con 128 gestantes con QF-PCR normal, en los que se realizó un array CGH, se obtuvo un caso (0,8%, IC 95% 0,0-4,9%) de CNV patogénica, cuatro casos (3,1%, IC 95% 1,0-8,3%) de CNV patogénicas que no se reportaron debido a su baja penetrancia. Se detectó un caso (0,8%, IC 95% 0,0-4,9%) de CNV patogénica que afectaba a un gen con herencia autosómica recesiva (no reportado) y 13 VUS (no reportadas) (10,2%, IC 95% 5,7-17,1%), (Figura 10).

6.4. GRUPO DE GESTANTES CON TRANSLUCENCIA NUCAL ≥ 3,5MM

De los 34 casos incluidos con un resultado de QF-PCR normal en los que se realizó array-CGH, se obtuvieron 4 casos (11,8%, IC 95% 3,8-28,4%) de CNV patogénica, un caso (2,9%, IC 95% 0,2-17,1%) de CNV patogénica no reportada por su baja penetrancia, un caso (2,9%, IC 95%

0,2-17,1%) de CNV patogénica que afectaba a un gen con herencia autosómica recesiva no reportada y cuatro casos no reportados (11,8%, IC 95% 3,8-28,4%) con VUS. (Figura 10).

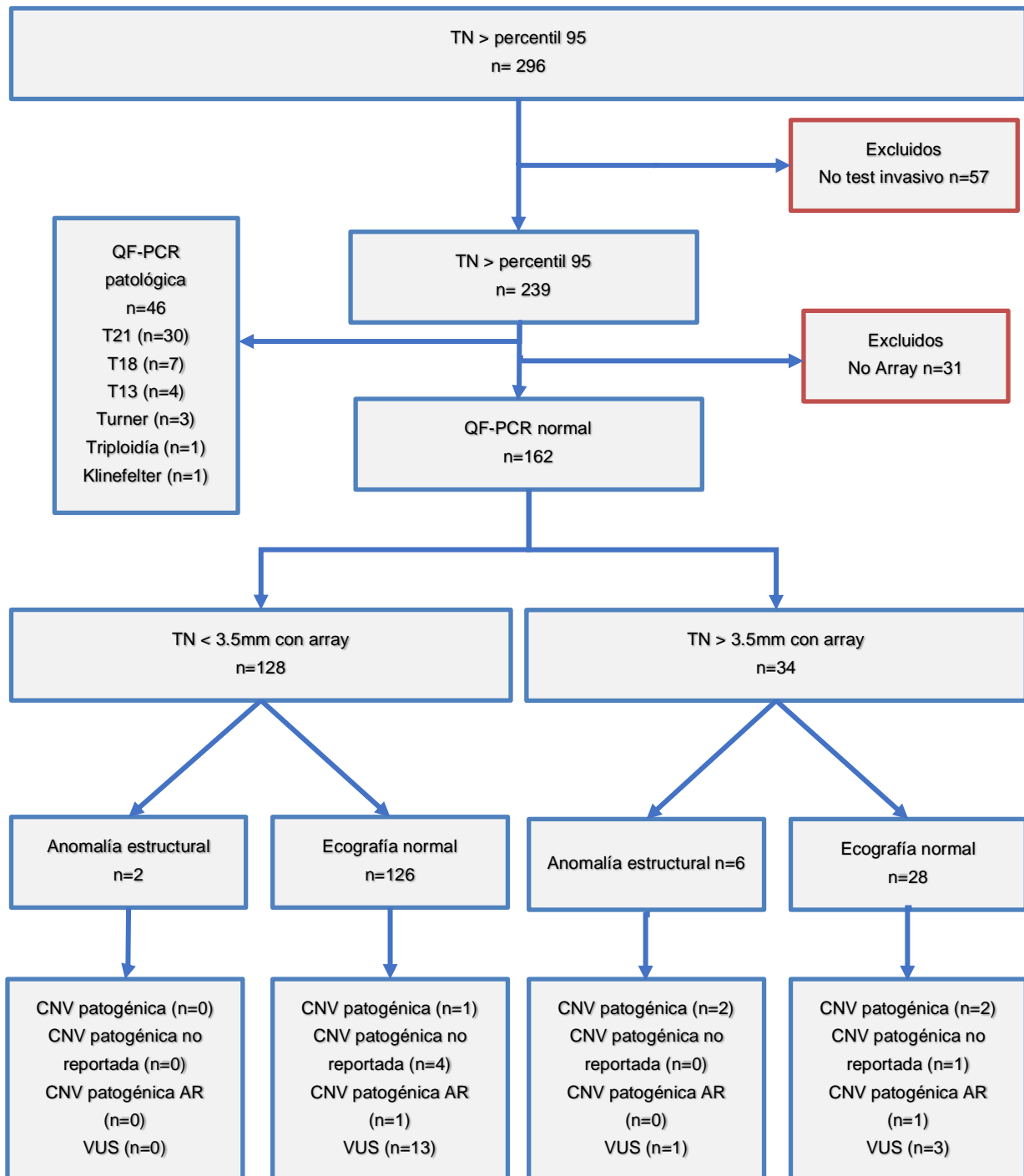


Figura 10. Diagrama de flujo que muestra la QF-PCR y los resultados de array en fetos con un grosor de translucencia nucal (TN) entre > percentil 95 y <3,5 mm, y aquellos con NT ≥3,5 mm, en fetos con y sin anomalías estructurales.

6.5. COMPARACIÓN DEL RESULTADO DE ARRAY EN FUNCIÓN DEL GROSOR DE LA TN

Al comparar los resultados del array entre los fetos con TN $\geq 3,5$ mm y los fetos con TN entre el 95 percentil y 3.4 mm, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.018$).

6.6. FETOS CON ANOMALÍAS ESTRUCTURALES

Ocho fetos tenían anomalías estructurales, incluidos dos defectos cardíacos (un caso con isomerismo izquierdo y uno de tronco arterioso) en el subgrupo de TN entre el percentil 95 y 3,4 mm, y 4 defectos cardíacos (un caso de atresia tricuspídea, uno de hipoplasia mitro aórtica, un síndrome del corazón izquierdo hipoplásico y un situs inversus), 1 onfalocele y 1 *“limb body wall complex”* en el subgrupo de TN $\geq 3,5$ mm.

Entre los dos fetos con TN entre el 95 percentil y 3.5 mm con anomalías estructurales no se encontró ninguna CNV ni VUS, (Figura 10, Tabla 4).

Entre los seis casos de fetos con TN $\geq 3,5$ mm y anomalías estructurales hubo dos (33.3%, IC 95% 6,0-75,9%) CNV patogénicas, una (16,7%, IC 95% 0,9-63,5%) CNV que afectaba a un gen con herencia autosómica recesiva y una (16,7%, IC 95% 0,9-63,5%) VUS (Figura 10, Tabla 4).

6.7. FETOS SIN ANOMALÍAS ESTRUCTURALES

De los 126 fetos con espesor de TN <3,5 mm y sin anomalía estructural, hubo un caso (0,8%, IC 95% 0,0-5,0%) de CNV patogénica, cuatro casos (3,2%, IC 95% 1,0-8,4%) de variante patogénica no informada, un caso (0,8%, IC 95% 0,0-5,0%) de CNV patogénica autosómica recesiva y 13 (10,3%, IC 95% 5,8-17,3%) casos de VUS, (Figura 10, Tabla 4).

Entre los 28 casos con TN \geq 3,5 mm y sin alteraciones estructurales, encontramos dos casos (7,1%, IC 95% 1,2-25,0%) de CNV patogénica, un caso (3,6%, IC 95% 0,2-20,2%) de variante patogénica no reportada un caso de CNV patogénica con herencia recesiva no reportada y tres casos de VUS (10,7%, IC 95% 2,8-29,4%) (Figura 10, Tabla 4).

Al comparar los resultados del array entre los fetos sin anomalías estructurales según tengan una TN mayor o menor de 3,5mm las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.292$).

6.8. COMPARACIÓN DEL RESULTADO DE ARRAY EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE MALFORMACIONES

Al comparar los resultados de array en fetos con TN \geq 3,5 mm entre fetos con o sin malformación las diferencias fueron significativas ($p=0.040$).

En fetos con TN<3.5 mm las diferencias entre feto con malformación o sin ella no fueron significativas ($p=1$)

La siguiente tabla (tabla 4) describe las variantes identificadas en el estudio de array en relación con el tamaño de la TN, en fetos con o sin anomalías estructurales asociadas.

6.9. VARIANTES DEL NÚMERO DE COPIAS

Se describen en la tabla 5 las CNV identificadas durante el estudio y que fueron reportadas y notificadas siguiendo las recomendaciones del consorcio Belgian Prenatal MicroArray (BEMAPRE) (59).

En la tabla 6 se muestran las variantes de número de copias patogénicas detectadas, pero no reportadas en el informe de resultado entregado a la gestante.

En la tabla 7 se describen las variantes de número de copias, de más de 400kb, de significado desconocido y por lo tanto no reportadas en el informe de resultado. En 4 casos, se identificó otra variante asociada a la VUS, tal como se observa en la tabla.

Tabla 4. Resultado de array-CGH en fetos con QF-PCR normal en relación con el grosor de la TN y en aquellos con o sin anomalías estructurales asociadas

	N	CNV patogénica	CNV no informada	CNV autosómica recesiva	VUS
Todos	162	5 (3.1%, 95%CI, 1.1-7.4%)	5 (3.1%, 95%CI, 1.1-7.4%)	2 (1.2%; 95%CI, 0.2-4.9%)	17 (10.4%, 95%CI, 6.4-16.5%)
TN p95-3,5mm	128	1 (0.8%, 95%CI 0.04-4.9%)	4 (3.1%, 95%CI 1.0-8.3%)	1 (0.8%, 95%CI 0.04-4.9%)	13 (10.1%, 95%CI 5.7-17.1%)
TN >3,5mm	34	4 (11.8%, 95%CI 3.8-28.4%)	1 (2.9%, 95%CI 0.1-17.1%)	1 (2.9%, 95%CI 0.1-17.1%)	4 (11.8%, 95%CI 3.8-28.4%)
Aislada	154	3 (1.9%, 95%CI 0.5-6.0%)	5 (3.2%, 95%CI 1.2-7.8%)	1 (0.6%, 95%CI 0.0-4.1%)	16 (10.4%, 95%CI 6.2-16.6%)
TN p95-3,5mm	126	1 (0.8%, 95%CI 0.45.0%)	4 (3.2%, 95%CI 1.0-8.4%)	1 (0.8%, 95%CI 0.45.0%)	13 (10.3%, 95%CI 5.8-17.3%)
TN >3,5mm	28	2 (7.1%, 95% CI 1.2-25.0%)	1 (3.6%, 95%CI 0.2-20.2%)	0	3 (10.7%, 95%CI 2.8-29.4%)
Anomalía estructural	8	2 (25%, 95% CI, 4.5-64.4%)	0	0	1 (12.5%, 95%CI 0.7-53.3%)
TN p95-3,5mm	2	0	0	0	0
TN>3,5mm	6	2 (33.3%, 95% CI, 6.0-75.9%)	0	1 (16.7%, 95%CI 0.9-63.5%)	1 (16.7%, 95%CI 0.9-63.5%)

CGH=Hibridación Genómica Comparada; TN=Translucencia Nucal; QF-PCR=Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente; CNV=Variante de número de copias, VUS=Variante de significado desconocido; CI= Intervalo de confianza.

Tabla 5. CNV detectadas en fetos con aumento de la TN

Caso	TN (mm)	Malformación estructural	Resultado Array-CGH	Tamaño (Mb)	Informado	Visible por citogenética	Síndrome desconocido Fetotipo del paciente	Resultado de la gestación, EG
1	4.4	None	arr[GRCh37] 2p25.3 p25.1(21191_11179952)x3, 9p24.3 p22.2(204090_17817087)x1	11.2, 17.6	Si	Si	der(2;9)(p25.1;p22.2)	ILE, 14 s
2	7.0	Hipoplasia de Cav izdas; micrognatia	arr[GRCh37] 10q24.1q26.3(97645096_13278968 3)x3	35.14	Si	Si	Distal trisomy 10q syndrome. Duplication also includes SHFM3, associated with an increased risk of Split hand/foot malformation	ILE, 14 s
3	9.3	No	arr[GRCh37] 3q24q29(143375759_197837069)x 3	54.46	Si	Si	Includes 3q29 duplication syndrome. 46,XX,+der (21)t(3;21)(q23;p11.2)mat	ILE, 13 s
4	3.4	No	arr[GRCh37] 22q11.21(18661725-21561514)x3	2.84	Si	No	22q11.2 microduplication syndrome	Vivo, 39 s
5	9.0	Hipoplasia mitro-aórtica	arr[GRCh37] 4p16.3p15.1(75647_35238188)x1, 4p15.2 p15.1(25428634_33080393)x1	35.16, 7.65	Si	Si*	Wolf-Hirschhorn syndrome	ILE, 14 s

*Anomalía compleja en la que la delección 4p16.3p15 es visible pero la 4p15.2p15.1 no lo es

TN= Translucencia nucal; CGH= Hibridación Genómica Comparada; ILE= Terminación legal del embarazo; EG=edad gestacional

Tabla 6. CNV patogénicas no reportadas detectadas en fetos con TN aumentada

Caso	NT (mm)	Malformación estructural	Resultado array-CGH	Tamaño (Mb)	Informado	Visible por citogenética	Síndrome conocido Fenotipo paciente	Resultado gestación, EG
6	4.1	No	arr[GRCh37] 16p13.11(15551062_16194575)x1	0.64	No	No	Recurrent 16p13.11 deletion (MYH11)	RN vivo, 39 s
7	2.9	No	arr[GRCh37] 16p13.11p12.3(15404476_18631990)x3	3.23	No	No	Recurrent 16p13.11 duplication (MYH11)	RN vivo, 37 s
8	3.1	No	arr[GRCh37] 16p13.11(14910213_16194575)x1	1.28	No	No	Recurrent 16p13.11 deletion (MYH11)	Desconocido
9	2.8	No	arr[GRCh37] 16p12.2(21959950_22517094)x1	0.56	No	No	Recurrent 16p12.1 deletion (CDR2)	RN vivo, 39 s
10	2.7	No	arr[GRCh37] 15q11.2(20750094_23217513)x1	2.47	No	No	Recurrent 15q11.2 deletion (NIPA1)	RN vivo, 38 s

TN= Translucencia nucal; CGH= Hibridación Genómica Comparada; ILE= Terminación legal del embarazo; EG= edad gestacional

Tabla 7. Varianes de número de copias de significado desconocido (VUS) detectadas en fetos con TN aumentada

Caso	TN (mm)	Malformación estructural en eco 1º t	Resultado, EG	Array-CGH Resultado	Tamaño (Mb)	Visible Por Citogenética	CNV adicional
2	7	Hipoplasia cav izq.	ILE, 14 s	arr[GRCh37]10q26.3 (152867296_135404550)x3	2.42	No	Patogénica
11	3	no	Vivo, 40 s	arr[GRCh37]22q11.21(18327965_19217516)x3	0.89	No	No
12	6.6	no	ILE, 14 s	arr[GRCh37]6q26(162351580_162584359)x1	0.23	No	Autosómica Recesiva
13	3.4	no	vivo, 37 s	arr[GRCh37]13q21.1(57537708_57894895)x3	0.36	No	No
14	3.4	no	Vivo, 37 s	arr[GRCh37]22q11.21 (20402618_2070893863)x3	0.31	No	No
15	2.6	no	Vivo, 40 s	arr[GRCh37]8q13.2-q13.3 (70395732_71035195)x3	0.64	No	No
16	4.9	no	Vivo, 40 s	arr[GRCh37]2q36.3 (230582408_230900153)x3	0.32	No	No
17	2.5	no	Vivo, 37 s	arr[GRCh37]Xp22.33 (2028363_230900153)x3	0.33	No	No
18	3.1	no	Vivo, 39 s	arr[GRCh37]22q11.21 (20402618_20708938)x3	0.31	No	No
19	2.4	no	Vivo, 41 s	arr[GRCh37]15q13.1 (28542085_29085888)x3	0.54	No	No
20	3.2	no	Vivo, 33 s	arr[GRCh37] Xp22.33 (440364_631797)x3	0.19	No	No
21	2.8	no	Vivo, 38 s	arr[GRCh37] 6p25.3 (253107_253107)x3	0.14	No	No
22	2.5	no	Vivo, 37 s	arr[GRCh37]1p31.1 (70841834_71195397)x3	0.35	No	No
23	2.8	no	Vivo, 29 s	arr[GRCh37]Xp11.22 (52154859_52480468)x3	0.33	No	No
24	5.6	Onfalocèle	ILE, 15 s	arr[GRCh37]2p23.2 (28551445_29065829)x3	0.51	no	No
25	2.8	no	Vivo, 41 s	arr[GRCh37]15q25.2 (82637753_83194766)x3	0.56	no	VUS
25	2.8	no	Vivo, 41 s	arr[GRCh37]Xp22.31 (8435932_8510040)x3	0.07	No	VUS
26	2.2	no	Vivo, 39 s	arr[GRCh37]11q25 (132275292_132806681)x3	0.53	No	No
27	3.5	no	Vivo, 40 s	arr[GRCh37]Xq28 (152867296_152969636)x3	0.1	No	No

TN= Translucencia nucal; CGH= Hibridación Genómica Comparada; ILE= Terminación legal del embarazo; EG= edad gestacional

6.10. TEST COMBINADO EN EL GRUPO CON TN ENTRE P95 Y <3,5MM.

Para entender cómo influyó el resultado de la prueba combinada en la decisión de realizar una prueba invasiva en el subgrupo de NT > percentil 95 y < 3,5 mm, decidimos analizar estos subgrupos. De los 226 fetos con TN entre el percentil 95 y < 3,5 mm, 150 tuvieron un riesgo bajo en la prueba combinada y 106 (70,7 %) se sometieron a una prueba invasiva. Sesenta y nueve fetos tenían alto riesgo y 62 (90,0%) se sometieron a una prueba invasiva. Siete mujeres rechazaron la prueba combinada y 4 de ellas también rechazaron una prueba invasiva.

6.11. RESULTADO DE LA GESTACIÓN

6.11.1 GRUPO DE GESTANTES CON TN > P95 HASTA 3,5 MM

Del total de 128 gestantes cuyos fetos presentaban una TN entre p95 y <3,5mm, y sometidas a procedimiento invasivo, hubo 2 (1,6%) interrupciones legales del embarazo (ILE) y 3 (2,34%) pérdidas de seguimiento. En total se obtuvieron 122 (95,3%) recién nacidos vivos, y un caso en el que se desencadenó el parto vaginal a las 20 semanas por un cuadro de corioamnionitis.

De los 122 recién nacidos vivos, hubo 11 (9,0%) gestaciones que finalizaron antes del término, entre las 35 y 36 semanas.

6.11.2. GRUPO DE GESTANTES CON TN >3,5MM

De las 34 gestantes con TN mayor o igual a 3,5 mm, sometidas a procedimiento invasivo, hubo 15 (44,1%) interrupciones legales de la gestación y una pérdida de seguimiento (2,9%). Uno de las interrupciones legales del embarazo fue una reducción fetal selectiva en una gestación gemelar bicorial biamniótico con un feto afecto de anomalía de array. Se obtuvieron 17 (50%) recién nacidos vivos y hubo un caso de óbito intrauterino a las 31 semanas en contexto de un hidrops fetal finalmente no filiado. De los recién nacidos vivos, en 2 (11,7%) casos la gestación finalizó antes del término a las 29 y 34 semanas.

7. DISCUSIÓN

7.1 HALLAZGOS PRINCIPALES

Para fetos con un grosor de TN por encima del percentil 95 y QF-PCR normal, la prevalencia de CNV patogénica fue del 3,1 %, con una gran diferencia entre los fetos con un grosor de TN entre el percentil 95 y 3,5 mm (0,8 %) y aquellos con $TN \geq 3,5\text{mm}$ (11,8%). En ausencia de anomalías estructurales, la prevalencia de CNV patogénicas se reduce al 1,9 %, con un 0,8 % para fetos con $TN < 3,5\text{ mm}$ y del 7,1 % para fetos con $TN \geq 3,5\text{ mm}$.

7.2 COMPARACIÓN CON LA LITERATURA

La asociación entre el aumento de TN y las CNV patogénicas se ha puesto de manifiesto ampliamente en la literatura (35). En fetos con $TN \geq 3,5\text{ mm}$, existe una mayor prevalencia de CNV patogénicas, como ha demostrado nuestro estudio y muchos otros. La pregunta es si se debe bajar el punto de corte de la TN a 3 mm o al percentil 95. Nuestra serie muestra una prevalencia del 0,8% (1 de 128) de CNV patogénicas (IC 95%, 0,0-4,9%) en fetos con un grosor de TN entre el percentil 95 y 3,5 mm, independientemente de la presencia de anomalías estructurales. Su *et al.* encontraron una prevalencia del 1,7 % (2 de 119) en fetos con TN de 2,5-3,4 mm (IC 95 %, 0,3-6,5 %) y Xue *et al.* hallaron una prevalencia del 2,6 % (3 de 114) en fetos con una TN entre el percentil 95 y 3,5 mm (IC 95 %, 0,7-8,1 %) (40,83) . Estas cifras son bastante similares si tenemos en cuenta el tamaño de los estudios y los

intervalos de confianza. Otros estudios que se centraron en fetos con TN entre 3,0 y 3,4 mm encontraron una prevalencia de CNV patogénica entre 0,37 y 1,89 % (41,74,75,77).

En nuestro estudio, la prevalencia de VUS fue del 10%, cifra superior a las reportadas por otros autores (Xue 2,4%, Su 1,6%) (39,40). Una posible explicación de esta discrepancia es que en nuestro análisis revisamos todas las CNV (incluidas las VUS), independientemente de que hayan sido comunicadas o no a la madre. Es posible que otros autores solo hayan incluido aquellas VUS y variantes patogénicas que se informaron a las gestantes, lo que subestima el número real de VUS y puede ser causa de discrepancias importantes entre los estudios.

El número de procedimientos invasivos está disminuyendo rápidamente en todo el mundo con la creciente implementación de pruebas de ADN libre de células (cfDNA) (84,85). Para los embarazos sin anomalías ecográficas, se han planteado preocupaciones sobre cómo CNV submicroscópicas patogénicas pueden pasarse por alto en las pruebas de cfDNA (86–88). Para fetos con TN $\geq 3,5$ mm, la mayoría de guías recomiendan realizar una prueba invasiva y un estudio de array y desaconsejan la prueba de cfDNA (89). Sin embargo, la indicación para el grupo con TN entre el percentil 95 y 3,5 mm sigue sin estar clara. Se debe informar a los padres que se enfrentan a la decisión de realizar una prueba de cfDNA o una prueba invasiva en estos intervalos de TN, de que las posibilidades de que el feto tenga una CNV patógena se encuentran entre el 0,8 % y el 2,6 % y que la cfDNA no la detectará (solo puede ser detectada de forma fiable mediante una prueba invasiva, actualmente por array)(40).

En nuestro estudio, mediante QF-PCR se detectaron 46 aneuploidías en 239 fetos con aumento de TN. Realizar QF-PCR tendría varios objetivos: determinar el sexo fetal antes de realizar el array-CGH, descartar una poliploidía o una contaminación materna, y otro de coste-efectividad, para descartar las aneuploidías más frecuentes, evitando así realizar un array en estos casos. Una de las cinco variantes patogénicas notificadas no se detectó en la resolución del cariotipo, lo que significa una tasa de detección aumentada en un 20 % en fetos con QF-PCR normal.

En el entorno prenatal, es un desafío ético informar variantes que causan trastornos de aparición tardía, variantes con penetrancia reducida/expresividad variable (CNV de susceptibilidad) y variantes para las que no hay información sobre posibles consecuencias, es decir, VUS. No existe un consenso internacional sobre las pautas a seguir para informar de estos hallazgos a los futuros padres. Sin embargo, como hemos visto anteriormente, algunas asociaciones científicas han desarrollado guías para evitar la ansiedad de los futuros padres y el sesgo negativo sobre una CNV con un resultado altamente incierto, que podría conducir potencialmente al estigma. No todos los centros o grupos adoptan estas pautas de manera uniforme, y los estudios publicados sobre el rendimiento de array pueden perder o subestimar los datos relacionados con la CNV si se basan solo en informes clínicos en lugar de datos originales del laboratorio. En nuestra serie, una proporción significativa de CNV patogénicas (tablas 2 y 3) no fueron reportadas, según las guías belgas, lo que aumenta el rendimiento patogénico real de 5 a 10 CNV.

Tres de las CNV patogénicas no informadas debido a su baja penetrancia involucran la región cromosómica 16p13.11 (Tabla 3), uno de los síndromes de microdelección/duplicación recurrente más frecuente. En la literatura, la microdelección de

16p13.11 se ha informado esporádicamente en fetos con aumento de la translucencia nucal (88), pero la prevalencia real de esta CNV es desconocida. Una prevalencia del 1,9% (4 en 162) es superior a 1,2-4,4/10000 reportada en controles (90,91) y plantea la posibilidad de que esta CNV pueda estar enriquecida en cohortes con aumento de TN pero que su presencia no se haya detectado porque es considerada como no informable en un contexto prenatal en muchos laboratorios (37,92). La mayoría de las CNV tienen frecuencias poblacionales muy bajas y, por lo tanto, las series publicadas, incluida la presente, no incluyen suficientes gestantes como para determinar con fiabilidad si el aumento de la TN también se asocia con una mayor prevalencia de otras CNV individuales recurrentes.

7.3 IMPLICACIONES CLÍNICAS

Los resultados de este estudio se pueden trasladar de forma inmediata a la práctica clínica en el momento de informar a unos padres cuyo feto presenta una TN aumentada, en función del grosor de la TN y de si hay anomalías estructurales o no en el momento de hacer la ecografía.

Así, ante un feto con una TN de 2.9 mm, sin anomalías estructurales, informaríamos de que el riesgo de encontrar una CNV patogénica es de 0,8%, mientras que si el feto tiene una TN de 4.6 mm y una sospecha de cardiopatía, la probabilidad sería de 33,3%. En base a estas

probabilidades los padres podrán tomar una decisión informada sobre someterse a una técnica invasiva o no.

El aumento que ha habido en los últimos años en la oferta de técnicas genéticas (QF-PCR, cariotipo, array, paneles, exoma, genoma) nos obliga a conocer el rendimiento de estas técnicas en cada indicación, para poder asesorar a los padres y ofrecer aquellas técnicas más adecuadas en la situación de cada paciente.

7.4 FORTALEZAS Y LIMITACIONES

Es habitual que tanto obstetras como gestantes tengan dudas sobre la conveniencia de realizar un estudio genético en el subgrupo TN entre el percentil 95 y 3,5 mm. En muchos centros de referencia la decisión se basa en el resultado de la prueba combinada, pero la evidencia no es tan sólida como en el grupo con $TN \geq 3,5$ mm. Una fortaleza de este estudio es que incluye 128 fetos en este subgrupo, donde la indicación de la prueba invasiva estuvo influenciada por la prueba combinada y no solo por la TN, lo que está más alineado con las necesidades clínicas de muchos centros de referencia. La aceptación de las pruebas invasivas fue mayor en las mujeres con alto riesgo en la prueba combinada (90 %) en comparación con el grupo de bajo riesgo (70 %).

Todas las CNV (patogénicas, VUS y benignas) se investigaron en todos los casos, pero, siguiendo las guías belga e inglesa, solo las CNV patogénicas se informaron a las mujeres. No se informaron variantes de baja penetrancia ni variantes que afecten a un gen recesivo,

si la frecuencia de portadores es baja. Dado que no existen directrices internacionales uniformes, existen variaciones entre las políticas de notificación de los laboratorios. La fortaleza de este estudio es que los datos se basan en los resultados de un único laboratorio y tiene en cuenta todas las CNV detectadas, informadas o no. Este hecho probablemente explica que nuestra proporción de VUS sea bastante alta, en comparación con otros estudios presumiblemente basados únicamente en las CNV notificadas.

Además, al ser un estudio unicéntrico, se facilitó la coherencia en la recogida de datos de las pruebas genéticas, ecográficas y el asesoramiento genético.

Una limitación del estudio es que, en los primeros años, hubo una heterogeneidad de manejo en el subgrupo de fetos con TN entre $>$ percentil 95 y $<$ 3,5 mm, ya que no siempre se realizaba el array-CGH, y se introdujo progresivamente en la práctica clínica hasta 2017, cuando se incluyó universalmente el array-CGH en todas las pruebas invasivas. Este hecho puede haber infra o supra estimado la tasa de CNV identificadas.

8. CONCLUSIONES

1. El estudio de Array permite la detección de anomalías submicroscópicas que no son visibles por cariotipo convencional en fetos con translucencia nucal aumentada.

2. El rendimiento del array es claramente superior en el grupo de TN $\geq 3,5$ mm con respecto al grupo de TN $\leq 3,5$ mm.

3. En fetos con TN $\geq 3,5$ mm el estudio de array permite detectar más variantes patogénicas en fetos con malformaciones estructurales que sin ellas.

4. En las gestaciones con TN aumentada existe un enriquecimiento notable de la CNV patogénica recurrente en la región 16p13.11

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Valenti C, Schutta EdwardJ, Kehaty T. PRENATAL DIAGNOSIS OF DOWN'S SYNDROME. *The Lancet*. julio de 1968;292(7561):220.
2. Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LCY, Kosinski P, Nicolaides KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21: Second-trimester screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*. marzo de 2013;41(3):247-61.
3. Nicolaides KH. First-Trimester Screening for Chromosomal Abnormalities. *Semin Perinatol*. agosto de 2005;29(4):190-4.
4. Cuckle H, Maymon R. Development of prenatal screening—A historical overview. *Semin Perinatol*. febrero de 2016;40(1):12-22.
5. Nicolaides KH, Heath V, Cicero S. Increased fetal nuchal translucency at 11–14 weeks. *Prenat Diagn*. abril de 2002;22(4):308-15.
6. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. septiembre de 1994;101(9):782-6.
7. Borrell A, Costa D, Martinez JM, Delgado RD, Farguell T, Fortuny A. Criteria for fetal nuchal thickness cut-off: a re-evaluation. *Prenat Diagn*. enero de 1997;17(1):23-9.
8. Borrell A, Quintó L, Fortuny A, Borobio V, Mercadé I, Goncé A, et al. Translucencia nuchal y ductus venoso: valores de referencia en el primer trimestre de la gestación. *Prog Obstet Ginecol*. agosto de 2006;49(8):434-40.
9. Sasse EA, editor. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. 2. ed. Wayne, Pa: NCCLS; 2000. 38 p. (NCCLS document).

10. Snijders R, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides K. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *The Lancet*. agosto de 1998;352(9125):343-6.
11. Tomás Alvaro Naranjo, Rosa Noguera-Salvá, Fernando Fariñas Guerrero. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Rev Esp Patol*. 42(4):249-61.
12. Iwasa J, Karp G, Marshall WF. Karp, biología celular y molecular: conceptos y experimentos. Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana; 2019.
13. Brand-Saberi B, Epperlein HH, Romanos GE, Christ B. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell Tissue Res*. septiembre de 1994;277(3):465-75.
14. von Kaisenberg CS, Krenn V, Ludwig M, Nicolaides KH, Brand-Saberi B. Morphological classification of nuchal skin in human fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12–18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anat Embryol (Berl)*. 23 de enero de 1998;197(2):105-24.
15. Vonkaisenberg C. Collagen type VI gene expression in the skin of trisomy 21 fetuses. *Obstet Gynecol*. marzo de 1998;91(3):319-23.
16. von Kaisenberg CS, Prols F, Nicolaides KH, Maass N, Meinhold-Heerlein I, Brand-Saberi B. Glycosaminoglycans and proteoglycans in the skin of aneuploid fetuses with increased nuchal translucency. *Hum Reprod*. diciembre de 2003;18(12):2544-61.
17. Ngo C, Viot G, Aubry MC, Tsatsaris V, Grange G, Cabrol D, et al. First-trimester ultrasound diagnosis of skeletal dysplasia associated with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol*. agosto de 2007;30(2):221-6.

18. Hyett J. Does nuchal translucency have a role in fetal cardiac screening? *Prenat Diagn.* 30 de diciembre de 2004;24(13):1130-5.
19. Atzei A, Gajewska K, Huggon IC, Allan L, Nicolaidis KH. Relationship between nuchal translucency thickness and prevalence of major cardiac defects in fetuses with normal karyotype: Cardiac defects and nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol.* agosto de 2005;26(2):154-7.
20. Makrydimas G, Sotiriadis A, Huggon IC, Simpson J, Sharland G, Carvalho JS, et al. Nuchal translucency and fetal cardiac defects: A pooled analysis of major fetal echocardiography centers. *Am J Obstet Gynecol.* enero de 2005;192(1):89-95.
21. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Eleftheriades M, Makrydimas G. Nuchal translucency and major congenital heart defects in fetuses with normal karyotype: a meta-analysis: NT and cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* septiembre de 2013;n/a-n/a.
22. Clur SA, Ottenkamp J, Bilardo CM. The nuchal translucency and the fetal heart: a literature review. *Prenat Diagn.* agosto de 2009;29(8):739-48.
23. Atton G, Gordon K, Brice G, Keeley V, Riches K, Ostergaard P, et al. The lymphatic phenotype in Turner syndrome: an evaluation of nineteen patients and literature review. *Eur J Hum Genet.* diciembre de 2015;23(12):1634-9.
24. de Mooij YM, van den Akker NMS, Bekker MN, Bartelings MM, Wisse LJ, van Vugt JMG, et al. Abnormal Shh and FOXC2 expression correlates with aberrant lymphatic development in human fetuses with increased nuchal translucency: INCREASED NUCHAL TRANSLUCENCY AND LYMPHATIC DEVELOPMENT. *Prenat Diagn.* septiembre de 2009;29(9):840-6.

25. Fukada Y, Yasumizu T, Takizawa M, Amemiya A, Hoshi K. The prognosis of fetuses with transient nuchal translucency in the first and early second trimester. *Acta Obstet Gynecol Scand.* enero de 1997;76(10):913-6.
26. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ.* 4 de abril de 1992;304(6831):867-9.
27. Cicero S. Sonographic Markers of Fetal Aneuploidy? A Review. *Placenta.* octubre de 2003;24:S88-98.
28. Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol.* abril de 2005;192(4):1005-21.
29. Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, Gajewska K, Nicolaides KH. Relation Between Increased Fetal Nuchal Translucency Thickness and Chromosomal Defects: *Obstet Gynecol.* enero de 2006;107(1):6-10.
30. Nicolaides KH. *The 11-13.6 week scan.* London; 2004. 71-94 p.
31. Bilardo CM, Müller MA, Pajkrt E, Clur SA, van Zalen MM, Bijlsma EK. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* julio de 2007;30(1):11-8.
32. Egloff M, Hervé B, Quibel T, Jaillard S, Le Bouar G, Uguen K, et al. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis in fetuses with isolated increased nuchal translucency: a French multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* diciembre de 2018;52(6):715-21.
33. Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn.* octubre de 2012;32(10):986-95.

34. de wit MC, Srebniak MI, Govaerts LCP, Van Opstal D, Galjaard RJH, Go ATJI. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature: Genomic microarray testing in fetuses with structural anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* febrero de 2014;43(2):139-46.
35. Grande M, Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, et al. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis: Microarray and increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol.* diciembre de 2015;46(6):650-8.
36. Cicatiello R, Pignataro P, Izzo A, Mollo N, Pezone L, Maruotti GM, et al. Chromosomal Microarray Analysis versus Karyotyping in Fetuses with Increased Nuchal Translucency. *Med Sci.* 27 de febrero de 2019;7(3):40.
37. Maya I, Yacobson S, Kahana S, Yeshaya J, Tenne T, Agmon-Fishman I, et al. Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis: NT and CMA. *Ultrasound Obstet Gynecol.* septiembre de 2017;50(3):332-5.
38. Zhao X-R, Gao L, Wu Y, Wang Y-L. Application of chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 18 de mayo de 2020;33(10):1749-54.
39. Su L, Huang H, An G, Cai M, Wu X, Li Y, et al. Clinical application of chromosomal microarray analysis in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. agosto de 2019 [citado 29 de octubre de 2021];7(8). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.811>

40. Xue S, Yan H, Chen J, Li N, Wang J, Liu Y, et al. Genetic Examination for Fetuses with Increased Fetal Nuchal Translucency by Genomic Technology. *Cytogenet Genome Res.* 2020;160(2):57-62.
41. Petersen OB, Smith E, Van Opstal D, Polak M, Knapen MFCM, Diderich KEM, et al. Nuchal translucency of 3.0-3.4 mm an indication for NIPT or microarray? Cohort analysis and literature review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* junio de 2020;99(6):765-74.
42. Pan M, Han J, Zhen L, Yang X, Li R, Liao C, et al. Prenatal diagnosis of fetuses with increased nuchal translucency using an approach based on quantitative fluorescent polymerase chain reaction and genomic microarray. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* febrero de 2016;197:164-7.
43. Lund ICB, Christensen R, Petersen OB, Vogel I, Vestergaard EM. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol.* enero de 2015;45(1):95-100.
44. Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Odibo A, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* octubre de 2019;54(4):442-51.
45. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* enero de 2015;45(1):16-26.
46. Tanvisut R, Wanapirak C, Piyamongkol W, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, et al. Cordocentesis-associated fetal loss and risk factors: single-center experience with 6650 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* noviembre de 2020;56(5):664-71.

47. The Wellcome Trust Case Control Consortium, Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. abril de 2010;464(7289):704-12.
48. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*. mayo de 2010;86(5):749-64.
49. committee opinion. Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol*. diciembre de 2016;128(6):e262-8.
50. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*. octubre de 2016;215(4):B2-9.
51. Giordano JL, Stosic M, Levy B, Wapner R. Chromosomal Microarray Analysis. En: *Perinatal Genetics* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 31 de marzo de 2022]. p. 125-36. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323530941000126>
52. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet*. enero de 2019;27(1):1-16.
53. del Campo M, Plaja A, Casals E, Figueras F, de la Chica R, Armengol L, et al. Recomendaciones para el uso clínico del microarray genómico en diagnóstico prenatal. *Prog Obstet Ginecol*. diciembre de 2015;58(10):470-3.

54. Suela J, López-Expósito I, Querejeta ME, Martorell R, Cuatrecasas E, Armengol L, et al. Recomendaciones para el uso de microarrays en el diagnóstico prenatal. *Med Clínica*. abril de 2017;148(7):328.e1-328.e8.
55. Armour CM, Dougan SD, Brock J-A, Chari R, Chodirker BN, DeBie I, et al. Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. *J Med Genet*. abril de 2018;55(4):215-21.
56. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis. *N Engl J Med*. 6 de diciembre de 2012;367(23):2175-84.
57. Stevens-Kroef M, Simons A, Rack K, Hastings RJ. Cytogenetic Nomenclature and Reporting. En: Wan TSK, editor. *Cancer Cytogenetics* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [citado 15 de noviembre de 2021]. p. 303-9. (Methods in Molecular Biology; vol. 1541). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6703-2_24
58. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*. 1 de febrero de 2020;22(2):245-57.
59. Muys J, Blaumeiser B, Jacquemyn Y, Bandelier C, Brison N, Bulk S, et al. The Belgian MicroArray Prenatal (BEMAPRE) database: A systematic nationwide repository of fetal genomic aberrations. *Prenat Diagn*. diciembre de 2018;38(13):1120-8.

60. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis: Prenatal CMA: cohort study and systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* junio de 2013;41(6):610-20.
61. Callaway JLA, Shaffer LG, Chitty LS, Rosenfeld JA, Crolla JA. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenat Diagn.* diciembre de 2013;33(12):1119-23.
62. Srebniak MI, Diderich KE, Joosten M, Govaerts LC, Knijnenburg J, de Vries FA, et al. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur J Hum Genet.* mayo de 2016;24(5):645-51.
63. Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* enero de 2015;45(1):27-35.
64. Sun L, Wu Q, Jiang S-W, Yan Y, Wang X, Zhang J, et al. Prenatal Diagnosis of Central Nervous System Anomalies by High-Resolution Chromosomal Microarray Analysis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1-9.
65. Scott F, Murphy K, Carey L, Greville W, Mansfield N, Barahona P, et al. Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: results from over 1000 consecutive cases: PND using array CGH. *Ultrasound Obstet Gynecol.* mayo de 2013;41(5):500-7.

66. Oneda B, Baldinger R, Reissmann R, Reshetnikova I, Krejci P, Masood R, et al. High-resolution chromosomal microarrays in prenatal diagnosis significantly increase diagnostic power: Prenatal high-resolution chromosomal microarray testing. *Prenat Diagn.* junio de 2014;34(6):525-33.
67. Van Opstal D, de Vries F, Govaerts L, Boter M, Lont D, van Veen S, et al. Benefits and Burdens of Using a SNP Array in Pregnancies at Increased Risk for the Common Aneuploidies. *Hum Mutat.* marzo de 2015;36(3):319-26.
68. Lee C-N, Lin S-Y, Lin C-H, Shih J-C, Lin T-H, Su Y-N. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies: Array CGH and prenatal diagnosis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* abril de 2012;119(5):614-25.
69. Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, Sessa M, Bono S, Spizzichino L, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet.* julio de 2013;21(7):725-30.
70. Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature: Prenatal diagnosis by chromosomal microarray. *Prenat Diagn.* abril de 2012;32(4):351-61.
71. Baer RJ, Norton ME, Shaw GM, Flessel MC, Goldman S, Currier RJ, et al. Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *Am J Obstet Gynecol.* diciembre de 2014;211(6):675.e1-675.e19.
72. Hellmuth SG, Pedersen LH, Miltoft CB, Petersen OB, Kjaergaard S, Ekelund C, et al. Increased nuchal translucency thickness and risk of neurodevelopmental disorders:

Neurodevelopmental follow-up after increased NT. *Ultrasound Obstet Gynecol.* mayo de 2017;49(5):592-8.

73. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, Society for Maternal-Fetal Medicine. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstet Gynecol.* octubre de 2020;136(4):e48-69.

74. Bardi F, Bosschieter P, Verheij J, Go A, Haak M, Bekker M, et al. Is there still a role for nuchal translucency measurement in the changing paradigm of first trimester screening? *Prenat Diagn.* enero de 2020;40(2):197-205.

75. Sagi-Dain L, Singer A, Ben Shachar S, Josefsberg Ben Yehoshua S, Feingold-Zadok M, Greenbaum L, et al. Risk of Clinically Significant Chromosomal Microarray Analysis Findings in Fetuses With Nuchal Translucency From 3.0 mm Through 3.4 mm. *Obstet Gynecol.* enero de 2021;137(1):126-31.

76. Grossman M. Here and there: a look at nursing in France. *Can Nurse.* octubre de 1979;75(9):30-1.

77. Hui L, Pynaker C, Bonacquisto L, Lindquist A, Poulton A, Kluckow E, et al. Reexamining the optimal nuchal translucency cutoff for diagnostic testing in the cell-free DNA and microarray era: results from the Victorian Perinatal Record Linkage study. *Am J Obstet Gynecol.* noviembre de 2021;225(5):527.e1-527.e12.

78. Vestergaard EM, Christensen R, Petersen OB, Vogel I. Prenatal diagnosis: array comparative genomic hybridization in fetuses with abnormal sonographic findings. *Acta Obstet Gynecol Scand.* julio de 2013;92(7):762-8.

79. Human Chromosomes: Principles & Techniques, 2nd edition, by Ram Verma and Arvind Babu, McGraw-Hill, Inc., New York, 1995, 419pp, \$55. *Mol Reprod Dev.* enero de 1996;43(1):134-134.
80. Cirigliano V. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 1 de octubre de 2001;7(10):1001-6.
81. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* julio de 2011;13(7):680-5.
82. Vanakker O, Vilain C, Janssens K, Van der Aa N, Smits G, Bandelier C, et al. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet.* marzo de 2014;57(4):151-6.
83. Su L, Huang H, An G, Cai M, Wu X, Li Y, et al. Clinical application of chromosomal microarray analysis in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. agosto de 2019 [citado 27 de enero de 2022];7(8). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.811>
84. Johnson K, Kelley J, Saxton V, Walker SP, Hui L. Declining invasive prenatal diagnostic procedures: A comparison of tertiary hospital and national data from 2012 to 2015. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* abril de 2017;57(2):152-6.
85. Kagan KO, Sonek J, Wagner P, Hoopmann M. Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for chromosomal abnormalities. *Arch Gynecol Obstet.* octubre de 2017;296(4):645-51.

86. Srebniak MI, Joosten M, Knapen MFCM, Arends LR, Polak M, van Veen S, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* abril de 2018;51(4):445-52.
87. Konialis C, Pangalos C, InterGenetics . Dilemmas in Prenatal Chromosomal Diagnosis Revealed Through a Single Center's 30 Years' Experience and 90,000 Cases. *Fetal Diagn Ther.* 2015;38(3):218-32.
88. Sotiriadis A, Papoulidis I, Siomou E, Papageorgiou E, Eleftheriades M, Papadopoulos V, et al. Non-invasive prenatal screening versus prenatal diagnosis by array comparative genomic hybridization: a comparative retrospective study: Retrospective study of NIPS versus aCGH. *Prenat Diagn.* junio de 2017;37(6):583-92.
89. Gardner C, Wellesley D, Kilby MD, et al. Recommendations for the Use of Chromosome Microarray in Pregnancy. En.
90. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJB, Breen G, Rucker J, Dixit A, et al. Male-Biased Autosomal Effect of 16p13.11 Copy Number Variation in Neurodevelopmental Disorders. Liu C, editor. *PLoS ONE.* 18 de abril de 2013;8(4):e61365.
91. Paciorkowski AR, Keppler-Noreuil K, Robinson L, Sullivan C, Sajjan S, Christian SL, et al. Deletion 16p13.11 uncovers *NDE1* mutations on the non-deleted homolog and extends the spectrum of severe microcephaly to include fetal brain disruption. *Am J Med Genet A.* julio de 2013;161(7):1523-30.
92. Maya I, Basel-Salmon L, Singer A, Sagi-Dain L. High-frequency low-penetrance copy-number variant classification: should we revise the existing guidelines? *Genet Med.* julio de 2020;22(7):1276-7.

10. ANEXOS

ANEXO 1

INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Sra. Mireia Navarro Sebastián, Secretaria del COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 404 el pasado 22/11/2019 y evaluó el proyecto de investigación PR(AMI)408/2019 , titulado *"ESTUDIO DE ARRAY-CGH EN FETOS CON TRANSLUCENCIA NUCAL AUMENTADA."* que tiene como investigador principal a la Dra. M^a Angeles Sánchez Durán del Servicio de nuestro Centro.

Versión de documentos

Memoria de Proyecto	versión 1 de 11/11/2019.
HIP/CI – Solicitud de exención	de fecha 02/09/2019

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

Aprobado

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

- Presidente:**
- SOLEDAD GALLEG0 MELCÓN (Médico)
Vicepresidente:
- JOAN SEGARRA SARRIES (Abogado)
Secretario:
- MIREIA NAVARRO SEBASTIAN (Química)

Vocales:

- LLUIS ARMADANS GIL (Médico)
- FERNANDO AZPIROZ VIDAUR (Médico)
- VALENTINA BALASSO (Médico)
- ESTHER CUCURULL FOLGUERA (Médico Farmacólogo)
- INES M DE TORRES RAMÍREZ (Médico)
- ELADIO FERNÁNDEZ LIZ (Farmacéutico de Atención Primaria)
- INMACULADA FUENTES CAMPS (Médico Farmacólogo)
- JAUME GUARDIA MASSÓ (Médico)
- JUAN CARLOS HORTAL IBARRA (Profesor de Universidad)
- MARIA LUJAN IAVECCHIA (Médico Farmacólogo)
- ALEXIS RODRIGUEZ GALLEGO (Médico Farmacólogo)
- JUDITH SANCHEZ RAYA (Médico)
- MARTA SOLÉ ORSOLA (Personal de Enfermería)
- PILAR SUÑÉ MARTÍN (Farmacéutica Hospital)
- VÍCTOR VARGAS BLASCO (Médico)
- GLORIA GÁLVEZ HERNANDO (Enfermería)
- ORIOL ROCA GAS (Médico)
- ESPERANZA ZURIGUEL PEREZ (Enfermería)

En dicha reunión del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

MIREIA
NAVARRO
SEBASTIAN

Firmado digitalmente por
MIREIA NAVARRO
SEBASTIAN
Fecha: 2019.11.22 15:10:28
+01'00'

Sra. Mireia Navarro

Secretaria técnica CEIM HUVH

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA AMNIOCENTESIS Y ARRAY CGH

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA

AMNIOCENTESIS Y ARRAY-CGH

Nombre:
NHC:
Fecha nacimiento:
DNI:

DECLARO que he solicitado del DOCTOR/A
la realización de una AMNIOCENTESIS y estudio ARRAY-CGH.

INFORMACIÓN QUE HE DE TENER EN CUENTA RESPECTO A ESTAS TÉCNICAS:

¿En qué consiste?

1. La amniocentesis es una técnica diagnóstica que consiste en la extracción de una muestra del líquido amniótico que envuelve al feto. Este líquido, que contiene células fetales, se obtiene realizando la punción de la pared abdominal y del útero con una aguja fina bajo control ecográfico.
2. Esta prueba se puede hacer a partir de la semana 15 de embarazo.
3. La amniocentesis nos permite realizar estudios cromosómicos, moleculares, bioquímicos y microbiológicos. En mi caso, se va a estudiar:
4. Con la muestra de líquido amniótico obtenida, el laboratorio realiza, en primer lugar, una técnica rápida (QF-PCR) para descartar las anomalías en número de cromosomas más frecuentes, entre ellas, el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21).
5. Si el resultado es normal, se continúa el estudio con la técnica de array-CGH que es un análisis del ADN de células fetales de diversa procedencia. Detecta desequilibrios de material genético (ganancias o pérdidas) responsables de enfermedades.
6. El array-CGH tiene la ventaja sobre el cariotipo convencional (estudio con microscopio de los cromosomas) de detectar algunas anomalías cromosómicas submicroscópicas (no visibles en el microscopio).

¿Qué complicaciones pueden aparecer?

La amniocentesis es una técnica invasiva que puede tener complicaciones. Como se realiza bajo control ecográfico continuo este riesgo es bajo pero puede producirse:

1. Hematoma o malestar en el punto de la punción.
2. Aborto (<0,5% de los casos) o parto prematuro.
3. Rotura de membranas (0,3% de los casos).
4. Punción fetal o del cordón.

5. Infección del líquido amniótico (inferior al 0,1% de los casos) que, excepcionalmente, puede complicarse con sepsis materna.
6. Hemorragia materna.
7. Por mi situación actual, el médico me ha explicado que pueden aumentar o aparecer riesgos o complicaciones como

¿Qué más tendría que tener en cuenta?

EN RELACIÓN A LA AMNIOCENTESIS

1. No hace falta ninguna preparación especial antes del procedimiento.
2. Después de la amniocentesis, recomendamos reposo absoluto domiciliario durante 24 horas y reposo relativo durante 1 semana.
3. La amniocentesis puede fracasar si no se consigue obtener suficiente líquido amniótico (1% de los casos).
4. Si usted es RhD negativa y desconocemos el Rh fetal, le tendremos que administrar gammaglobulina anti-D intramuscular después de la prueba.

EN RELACIÓN AL ARRAY-CGH

1. El array-CGH requiere una cantidad suficiente de ADN de buena calidad que se obtiene a partir de las células fetales que encontramos en el líquido amniótico. En caso de muestra insuficiente o de contaminación con células maternas, el resultado puede retrasarse. En estos casos, se debe esperar al cultivo celular o incluso en algunos casos puede ser necesario obtener una nueva muestra (nueva amniocentesis).
2. El array-CGH detecta variantes en el número de copias, es decir, desequilibrios (pérdidas o ganancias de material genético).
3. La combinación de la QF-PCR y el array-CGH no detecta todas las anomalías genéticas, como por ejemplo:
 - a. Anomalías cromosómicas que no alteren la cantidad (ganancias o pérdidas) de material genético, como son las translocaciones equilibradas, inversiones...
 - b. Pequeñas anomalías que estén por debajo de su resolución (100 Kb de media).
 - c. Alteraciones genéticas debidas a mutaciones puntuales (enfermedades monogénicas).
 - d. Anomalías que estén en mosaico (alteración presente sólo en algunas de las células de origen fetal) en baja proporción.
4. El array-CGH no detecta los defectos congénitos no genéticos. Por tanto, un resultado normal no descarta la posibilidad de que el recién nacido pueda sufrir algún defecto de otro tipo.
5. Se informarán sólo las variantes en el número de copias (ganancias o pérdidas) que tengan implicación clínica. Por tanto, no se informarán los hallazgos que no tengan significación clínica (benignos), ni los que, con los conocimientos en el momento de la realización del informe, tengan un significado incierto.
6. No se informarán las variantes en el número de copias que impliquen genes asociados a enfermedades recesivas de baja prevalencia en la población.

7. En algunos casos (1%), no se puede hacer un diagnóstico de seguridad debido a la sospecha de un mosaico celular (alteración presente sólo en algunas de las células de origen fetal analizadas) o de una anomalía que probablemente sólo esté presente en la placenta (discordancia entre tejido corial y fetal). A veces, puede ser recomendable una nueva amniocentesis.
8. En ocasiones, es necesario solicitar un estudio array-CGH a los progenitores para aclarar las implicaciones clínicas de los hallazgos.
9. Por razones biológicas, técnicas o científicas, cabe excepcionalmente la posibilidad de error diagnóstico: resultado falsamente positivo (se informa de una anomalía cromosómica que no existe) o resultado falsamente negativo (resultado normal a pesar de haber una anomalía cromosómica fetal).

¿Qué resultados se obtienen?

Conociendo las limitaciones del array-CGH, los resultados esperados son:

1. **Normal o negativo:** no se identifica ninguna variante en el número de copia (ganancia o pérdida de material genético) de significado patológico y penetrancia elevada, de acuerdo con el conocimiento científico actual.
2. **Patológico:** se identifica una o más variantes en el número de copia que implican afectación fetal.
3. **Incierto probablemente patológico:** se identifica una o más variantes en el número de copia que implican una probable afectación fetal.
4. **Incierto:** absoluto desconocimiento de los efectos de la variante en el momento de la realización del informe. Esta variante no se reporta en el informe de array-CGH prenatal.
5. **Benigno e incierto probablemente benigno:** la variante encontrada está descrita en población general (personas sanas) y, a priori, no implica afectación fetal. Estos hallazgos tampoco se reportan en el informe prenatal.

Hallazgos que sólo se informarán a petición de la gestante: (Rellene los espacios con SÍ o NO)

- QUIERO que se me comunique cualquier información, considerada clínicamente relevante para mi salud o la de mi familia, que se encuentre en el estudio de array-CGH, esté o no directamente relacionada con el objeto del análisis.
- QUIERO que se me informe de las variantes detectadas responsables de patología de aparición tardía, teniendo en cuenta que yo o mi pareja podemos ser portadores de la misma alteración.
- QUIERO que se me informe de las variantes detectadas asociadas a enfermedades de baja penetrancia (cuando sólo unos pocos individuos de los que tiene la variante genética presentan la enfermedad), aun cuando las guías internacionales de diagnóstico prenatal no lo aconsejen.
- QUIERO que se me informe, si es el caso, del estado de portador sano de enfermedades recesivas (enfermedades que requieren que las dos copias de un gen estén alteradas) detectadas en el estudio de array-CGH.

He sido informada por el equipo médico de las características de la amniocentesis y de las complicaciones más habituales que pueden aparecer, así como de las limitaciones y los resultados esperados de la técnica de array-CGH. La información se me ha dado de forma clara y mis preguntas han sido contestadas. Estoy satisfecha con la información recibida y entiendo el alcance y los riesgos de la prueba, por lo cual libremente (rellene con **SÍ** o **NO**):

..... Doy mi consentimiento para que se me realice una amniocentesis y el estudio array-CGH

..... Doy mi consentimiento para que las muestras excedentes se guarden en el laboratorio del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por el interés que pueden tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales mías y de mis familiares, incluso en caso de defunción

..... Doy mi consentimiento para que los resultados del diagnóstico genético puedan darse a conocer en la comunidad científica mediante comunicaciones o publicaciones, preservando mi identidad

Barcelona, a

Firmado: EL/LA MÉDICO

LA PACIENTE

Firmado: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

- Nombre:

- Edad: - DNI:

REVOCACIÓN

Revoco el consentimiento dado el día y no deseo proseguir con el estudio propuesto, que doy finalizado en esta fecha.

Revoco el consentimiento dado el día y no deseo que se efectúe el almacenaje de la muestra excedente.

Revoco el consentimiento dado el día y no deseo que se utilicen mis resultados del diagnóstico genético en la comunidad científica.

Barcelona, a

Firmado: EL/LA MÉDICO

LA PACIENTE

Firmado: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

- Nombre:

- Edad: - DNI:

Pàgina 4 de 4

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA CORIAL Y ARRAY CGH

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA

BIOPSIA CORIAL Y ARRAY-CGH

Nombre:
NHC:
Fecha nacimiento:
DNI:

DECLARO que he solicitado del DOCTOR/A
la realización de una BIOPSIA CORIAL y estudio ARRAY-CGH.

INFORMACIÓN QUE HE DE TENER EN CUENTA RESPECTO A ESTAS TÉCNICAS:

¿En qué consiste?

1. La biopsia corial es una técnica diagnóstica que consiste en la extracción de una muestra de tejido placentario con el objetivo de realizar estudios genéticos (cromosómicos o moleculares).
2. Siempre se hace bajo control ecográfico y la podemos hacer:
 - a. Vía vaginal: se coloca un espéculo y se llega a la placenta con una pinza a través del cuello del útero.
 - b. Vía abdominal: mediante una punción abdominal con aguja fina.
3. La biopsia de corion se puede hacer entre las 11 y las 14 semanas de embarazo.
4. Con la muestra de placenta obtenida, el laboratorio realiza, en primer lugar, una técnica rápida (QF-PCR) para descartar las anomalías en número de cromosomas más frecuentes, entre ellas, el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21).
5. Si el resultado es normal, se continúa el estudio con la técnica de array-CGH que es un análisis del ADN que detecta desequilibrios de material genético (ganancias o pérdidas) responsables de enfermedades.
6. El array-CGH tiene la ventaja sobre el cariotipo convencional (estudio con microscopio de los cromosomas -ADN-) de detectar algunas anomalías cromosómicas submicroscópicas (no visibles en el microscopio).

¿Qué complicaciones pueden aparecer?

La biopsia corial es una técnica invasiva que puede provocar a veces algunas de las complicaciones siguientes:

1. Sangrado vaginal en un 30% de las biopsias que se hacen vía vaginal, que, a priori, no implica mal pronóstico.
2. Hematoma retrocorial (detrás de la placenta) (0,3% de los casos).
3. Aborto (< 0,5% de los casos).
4. Rotura de membranas (0,3% de los casos).

5. Dolor leve, molestia o hematoma superficial en la zona de la punción, en el caso de haberse realizado por vía abdominal.
6. Infección (inferior al 0,1% de los casos) que, excepcionalmente, puede complicarse con sepsis materna.
7. Por mi situación actual, el médico me ha explicado que pueden aumentar o aparecer riesgos o complicaciones como

¿Qué más tendría que tener en cuenta?

EN RELACIÓN A LA BIOPSIA CORIAL

1. No hace falta ninguna preparación especial antes del procedimiento.
2. Después de la biopsia corial, recomendamos reposo absoluto domiciliario durante 24 horas y reposo relativo durante 1 semana.
3. La biopsia corial puede fracasar si no se consigue obtener suficiente muestra (1-2%).
4. Si usted es RhD negativa y desconocemos el Rh fetal, le tendremos que administrar gammaglobulina anti-D intramuscular después de la prueba.

EN RELACIÓN AL ARRAY-CGH

1. El array-CGH requiere una cantidad suficiente de ADN de buena calidad que se obtiene a partir de las células procedentes de las vellosidades coriales. En caso de muestra insuficiente o de contaminación con células maternas, el resultado puede retrasarse. En estos casos, se debe esperar al cultivo celular o incluso en algunos casos puede ser necesario obtener una nueva muestra (repetir la biopsia corial o realizar una amniocentesis).
2. El array-CGH detecta variantes en el número de copias, es decir, desequilibrios (pérdidas o ganancias de material genético).
3. La combinación de la QF-PCR y el array-CGH no detecta todas las anomalías genéticas, como por ejemplo:
 - a. Anomalías cromosómicas que no alteren la cantidad (ganancias o pérdidas) de material genético, como son las translocaciones equilibradas, inversiones...
 - b. Pequeñas anomalías que estén por debajo de su resolución (100 Kb de media).
 - c. Alteraciones genéticas debidas a mutaciones puntuales (enfermedades monogénicas).
 - d. Anomalías que estén en mosaico (alteración presente sólo en algunas de las células de origen fetal) en baja proporción.
4. El array-CGH no detecta los defectos congénitos no genéticos. Por tanto, un resultado normal no descarta la posibilidad de que el recién nacido pueda sufrir algún defecto de otro tipo.
5. Se informarán sólo las variantes en el número de copias (ganancias o pérdidas) que tengan implicación clínica. Por tanto, no se informarán los hallazgos que no tengan significación clínica (benignos), ni los que, con los conocimientos en el momento de la realización del informe, tengan un significado incierto.
6. No se informarán las variantes en el número de copias que impliquen genes asociados a enfermedades recesivas de baja prevalencia en la población.

7. En algunos casos (1%), no se puede hacer un diagnóstico de seguridad, debido a la sospecha de un mosaico celular (alteración presente sólo en algunas de las células de origen fetal analizadas) o de una anomalía que probablemente sólo esté presente en la placenta (discordancia entre tejido corial y fetal). A veces, puede ser recomendable una amniocentesis posterior.
8. En ocasiones, es necesario solicitar un estudio array-CGH a los progenitores para aclarar las implicaciones clínicas de los hallazgos.
9. Por razones biológicas, técnicas o científicas, cabe excepcionalmente la posibilidad de error diagnóstico: resultado falsamente positivo (se informa de una anomalía cromosómica que no existe) o resultado falsamente negativo (resultado normal a pesar de haber una anomalía cromosómica fetal).

¿Qué resultados se obtienen?

Conociendo las limitaciones del array-CGH, los resultados esperados son:

1. **Normal o negativo:** no se identifica ninguna variante en el número de copia (ganancia o pérdida de material genético) de significado patogénico y penetrancia elevada, de acuerdo con el conocimiento científico actual.
2. **Patogénico:** se identifica una o más variantes en el número de copia que implican afectación fetal.
3. **Incierto probablemente patogénico:** se identifica una o más variantes en el número de copia que implican una probable afectación fetal.
4. **Incierto:** absoluto desconocimiento de los efectos de la variante en el momento de la realización del informe. Esta variante no se reporta en el informe de array-CGH prenatal.
5. **Benigno e incierto probablemente benigno:** la variante encontrada está descrita en población general (personas sanas) y, a priori, no implica afectación fetal. Estos hallazgos tampoco se reportan en el informe prenatal.

Hallazgos que sólo se informarán a petición de la gestante: (Rellene los espacios con SÍ o NO)

- QUIERO que se me comunique cualquier información, considerada clínicamente relevante para mi salud o la de mi familia, que se encuentre en el estudio de array-CGH, esté o no directamente relacionada con el objeto del análisis.
- QUIERO que se me informe de las variantes detectadas responsables de patología de aparición tardía, teniendo en cuenta que yo o mi pareja podemos ser portadores de la misma alteración.
- QUIERO que se me informe de las variantes detectadas asociadas a enfermedades de baja penetrancia (cuando sólo unos pocos individuos de los que tiene la variante genética presentan la enfermedad), aun cuando las guías internacionales de diagnóstico prenatal no lo aconsejen.
- QUIERO que se me informe, si es el caso, del estado de portador sano de enfermedades recesivas (enfermedades que requieren que las dos copias de un gen estén alteradas) detectadas en el estudio de array-CGH.

He sido informada por el equipo médico de las características de la biopsia corial y de las complicaciones más habituales que pueden aparecer, así como de las limitaciones y los resultados esperados de la técnica de array-CGH. La información se me ha dado de forma clara y mis preguntas han sido contestadas. Estoy satisfecha con la información recibida y entiendo el alcance y los riesgos de la prueba, por lo cual libremente (rellene con **SÍ** o **NO**):

..... Doy mi consentimiento para que se me realice una biopsia corial y el estudio array-CGH
..... Doy mi consentimiento para que las muestras excedentes se guarden en el laboratorio del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por el interés que pueden tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales mías y de mis familiares, incluso en caso de defunción
..... Doy mi consentimiento para que los resultados del diagnóstico genético puedan darse a conocer en la comunidad científica mediante comunicaciones o publicaciones, preservando mi identidad

Barcelona, a

Firmado: EL/LA MÉDICO LA PACIENTE

Firmado: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

- Nombre:
- Edad: - DNI:

REVOCACIÓN

- Revoco el consentimiento dado el día y no deseo proseguir con el estudio propuesto, que doy finalizado en esta fecha.
- Revoco el consentimiento dado el día y no deseo que se efectúe el almacenaje de la muestra excedente.
- Revoco el consentimiento dado el día y no deseo que se utilicen mis resultados del diagnóstico genético en la comunidad científica.

Barcelona, a

Firmado: EL/LA MÉDICO LA PACIENTE

Firmado: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

- Nombre:
- Edad: - DNI:

ANEXO 4

ARTICULO ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN

ARRAY STUDY IN FETUSES WITH NUCHAL TRANSLUCENCY ABOVE THE 95TH PERCENTILE: A 4-YEAR OBSERVATIONAL SINGLE-CENTRE STUDY

**REVISTA: Archives of Gynecology and Obstetrics.
ARCH-D-22-00418R1.**

Array study in fetuses with nuchal translucency above the 95th percentile: a 4-year observational single-centre study

Edgar Coello Cahua. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain.

María Ángeles Sánchez-Durán. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0001-9767-2564)

Inés Calero. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain.

María Teresa Higuera. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0003-2154-0420)

Mayte Avilés García. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0003-3010-8752)

Carlota Rodó. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0001-8801-5677)

Nerea Maiz. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0001-8261-6383)

Alberto Plaja Rustein. Molecular and Clinical Genetics Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0002-2398-1134)

Neus Castells Sarret. Molecular and Clinical Genetics Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0001-5734-3539)

Carmen Mediano Vizuete. Molecular and Clinical Genetics Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain.

Elena Carreras. Maternal-Fetal Medicine Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. (ORCID: 0000-0003-3471-7248).

Corresponding author:

Nerea Maiz

Maternal-Fetal Medicine Department, Hospital Vall d'Hebron. Ps. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona. E-mail: nmaiz@vhebron.net

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the performance of chromosomal microarray analysis (CMA) in fetuses with nuchal translucency (NT) > 95th percentile. Secondary objectives were to analyze these results according to NT thickness, below or above 3.5 mm, and those without associated anomalies.

Methods: This observational single-cohort study was conducted between 2015 and 2018 in fetuses with NT>95th percentile. Following an invasive test, quantitative fluorescence-polymerase chain reaction (QF-PCR) was performed, and if normal, CMA was performed. Pathogenic copy-number variants (CNVs), non-reported pathogenic CNV, pathogenic autosomal recessive variants and variants of unknown significance (VUS) were analysed.

Results: One-hundred and sixty-two fetuses with NT>95th percentile, normal QF-PCR and CMA were included. Amongst 128 fetuses with NT between the 95th percentile and 3.5 mm, one (0.8%) had a pathogenic CNV, four (3.1%) had non-reported pathogenic CNV, one (0.8%) had pathogenic autosomal recessive variant and 13 (10.2%) had VUS. Amongst 34 fetuses with NT≥3.5mm, four (11.8%) had pathogenic CNV, one (2.9%) had non-reported pathogenic CNV, one (2.9%) had pathogenic autosomal recessive variant and four (11.8%) had VUS. Four in 162 (2.5%) fetuses had CNVs at the chromosome 16p13.11 region. Amongst 154 fetuses without structural abnormalities and normal QF-PCR, three (1.9%) had a pathogenic CNV, 5 (3.2%) had non-reported pathogenic CNV, one (0.6%) autosomal recessive pathogenic CNV and 16 (10.4%) had VUS.

Conclusion: Pathogenic CNVs were found in 1% of fetuses with an NT thickness between the 95th percentile and 3.5 mm and in 12% of fetuses with NT≥3.5 mm. CNVs were found at the 16p13.11 region in 2.5% of cases.

Keywords: Array-CGH, chromosomal microarray analysis, Nuchal Translucency Measurement; Ultrasonography, Prenatal; Fetus; Karyotype.

Abbreviations: NT, nuchal translucency; CGH, comparative genomic hybridization; CNV, copy number variant; QF-PCR, quantitative fluorescence-polymerase chain reaction; CMA, chromosomal microarray analysis; VUS, variant of unknown significance; SD, standard deviation; CI, confidence interval; cfDNA, cell-free DNA.

Key Message (40/40)

In fetuses with NT >95th percentile and normal QF-PCR, the prevalence of pathogenic CNVs was 3.1%, despite large differences in fetuses with NT above or below 3.5 mm. CNVs were located at the chromosomal region 16p13.11 in 2.5% of cases.

INTRODUCTION

Increased nuchal translucency (NT) is associated with a high risk of chromosomal abnormalities, major fetal defects and a wide range of genetic syndromes [1–3]. It is also associated with an increased risk of miscarriage, fetal death and neurodevelopmental abnormalities [4].

An important number of genetic syndromes are caused by copy-number variants (CNVs), often non-detectable on the first-trimester ultrasound scan and frequently below the average karyotyping resolution of 5–10 Mb [5], but detectable by array-based techniques. Several studies have demonstrated the advantages of performing chromosomal microarray analyses (CMA) in the prenatal setting to evaluate fetuses with major structural abnormalities or fetal growth restriction [5–10]. A meta-analysis performed on fetuses with isolated increased NT showed that 4% of these fetuses had a pathogenic CNV, not detectable by karyotype testing, with some variability attributable to differences in the NT cut-off points and the type of array used [11].

The aim of this study was to evaluate the performance of CMA for the detection of all CNVs, whether reported or not, in fetuses with increased NT. Secondary objectives were to analyze these results according to NT thickness (below or above 3.5 mm) and according to the potential presence of associated anomalies.

MATERIAL AND METHODS

This observational single-cohort study was conducted at Vall d'Hebron University Hospital between January 2015 and December 2018.

The study included fetuses with an NT thickness above the 95th percentile at gestational ages between 11⁺⁰ and 13⁺⁶ weeks. Exclusion criteria were lack of invasive test, abnormal QF-PCR and lack of CMA.

NT measurements were conducted according to the Fetal Medicine Foundation protocol [12].

Our site's protocol for first-trimester aneuploidy screening is based on combined testing [13, 14], obtaining a serum sample for pregnancy-associated plasma protein-A and beta-human chorionic gonadotropin measurements at gestational ages between 8 and 13⁺⁶ weeks, and an ultrasound scan for measurements of the crown-rump length (CRL) and NT thickness at gestational ages between 11⁺⁰ and 13⁺⁶

weeks. All women with fetuses having an NT thickness above the 99th percentile (3.5 mm)[15] were offered an invasive test. When NT thickness was above the 95th percentile but below 3.5 mm, recommendations for an invasive test were based on the combined risk. In the group of women with an intermediate risk (1/250 to 1/1000) additional markers (nasal bone, ductus venosus flow, tricuspid regurgitation) were assessed and the risk was modified accordingly [16].

All women were referred to the Prenatal Diagnostics Unit to undergo the invasive procedure. Pre-test counselling included information about the risks associated with the procedure and the diagnostic techniques involved. Women were informed that benign CNVs, VUS or low-penetrance variants would not be reported unless otherwise stated.

Depending on indication and gestational age, genetic testing was performed on chorionic villus samples or amniotic fluid. In all samples, quantitative fluorescence-polymerase chain reaction (QF-PCR) was performed as a first-tier diagnostic test for rapid evaluation of the most frequent chromosomal aneuploidies, including those involving chromosomes 21, 18, 13 or sex chromosomes.

During 2015-2016, QF-PCR and karyotype testing were performed in all samples, and array comparative genomic hybridization (array-CGH) testing was performed only for cases with normal karyotype and NT thickness above 3.5 mm. From 2017 onwards, karyotype testing was only performed in cases with aneuploidy detected by QF-PCR to rule out structural chromosomal abnormalities, such as translocations, whereas array-CGH was performed in the remaining cases. Finally, karyotype testing was performed in a minority of cases to allow complete characterization of specific array findings. DNA was extracted from both uncultured and cultured cells and, once the requested studies were performed, the remnants were stored for further genetic testing. Based on the results obtained, an echocardiographic examination and a morphological ultrasound scan were performed at 16 and 20 weeks of pregnancy.

Genetic testing

If possible, two independent cell cultures were prepared according to standard procedures as a back-up in case of technical issues with fresh samples and to allow

chromosomal analysis, if necessary [17]. The remaining sample was used for genomic DNA extraction.

For QF-PCR testing, DNA from cultured samples was extracted following a resin-based procedure (Instagene Matrix; Bio-Rad Laboratories, USA) as described in the literature [18]. whereas DNA from uncultured chorionic villus samples was extracted using the same technique as in array-CGH (see below). DNA from uncultured or cultured amniotic fluid samples and chorionic villus samples for the array-CGH technique was extracted using the iGENatal™ genomic DNA extraction kit (igenbiotech, Spain) following the manufacturer's instructions.

QF-PCR was performed with Devyser Complete QF-PCR kits (Devyser, Sweden) or Aneufast (Genomed AG, Switzerland) following the manufacturer's instructions. According to the standard protocol, if aneuploidies were detected by QF-PCR, conventional cytogenetic testing of 20 cultured amniotic fluid cells from two independent flasks was performed using G-banding (14) to confirm the results and rule out structural chromosomal abnormalities. Otherwise, fetal DNA was analyzed using the CytoSure™ Constitutional 8 × 60K v3 (ogt, UK) or qChip® Pre 8 x 60K (qGenomics, Spain) kits for array comparative genomic hybridization testing following the manufacturer's instructions.

CNVs were classified according to the standards and guidelines of the American College of Medical Genetics for the interpretation and reporting of postnatal constitutional CNVs, and were reported following international recommendations [19–22]. In brief, rare recessive variants not related to fetal phenotypic abnormalities and CNVs classified as benign, VUS and low-penetrance variants were not reported to the mother. All variants, reported or not, were included in our analysis, except benign CNVs or VUS smaller than 400 kb.

The results were reported in a specific consultation for post-test genetic counselling, where the results and implications crucial to support informed decision-making were explained to the women.

Variables

Main outcome: The result of the array-CGH was classified as normal or CNV, and these were classified as pathogenic CNV, Non-reported pathogenic CNV, autosomal recessive CNV and VUS.

The result of the QF-PCR was classified as normal or abnormal, if aneuploidies were detected.

NT was classified as normal (<95th percentile), between 95th percentile and 3.49mm, or ≥ 3.5 mm.

Statistical analysis

All data were recorded in an electronic database. Any direct identifier was removed and replaced by a code.

For the descriptive analysis, continuous data were described as the mean and standard deviation (SD). Categorical variables were reported as the absolute number and percentage. The 95% confidence intervals (CI) for proportions were estimated using the one-sample proportion test with the Yate's continuity correction. The statistical software R (version 3.6.0) was used for the analysis.

RESULTS

During the study period, a total of 296 pregnant women with fetuses having an NT thickness above the 95th percentile were referred to our unit. Fifty-seven (19.3%) declined invasive testing. Of the 239 who underwent an investive test (192 chorion villous sampling and 47 amniocentesis), 46 (19.2%) had an abnormal QF-PCR, and in 31 cases, a CMA was not performed and therefore were excluded from the analysis. From the 162 with normal QF-PCR, 128 (79.0%) had an NT thickness <3.5 mm, and 34 (21.0%) had an NT thickness ≥ 3.5 mm.

The mean maternal age was 31.2 years old (SD, 5.4), and the mean fetal CRL was 61.9 mm (SD, 8.3): 155 were singleton pregnancies, 7 were dichorionic diamniotic twin pregnancies. In all multiple gestations, only one of the fetuses had increased NT.

Eight fetuses had structural abnormalities, including two cardiac defects (one case of lef isomerism and one of truncus arteriosus) in the subgroup of NT between 95th percentile and 3.4 mm, and 4 cardiac defects (one case each of tricuspid atresia, mitro-aortic hypoplasia, hypoplastic left heart syndrome, situs inversus), 1 exomphalos and 1 limb body wall complex in the subgroup of NT ≥ 3.5 mm.

Perinatal outcome

Four of the 162 fetuses were missed to follow-up. From the remaining 158 fetuses, 139 (87.9%) resulted in live births, one (0.6%) in a stillbirth, 17 (10.8%) in termination of pregnancy and one (0.6%) in miscarriages.

NT thickness between the 95th percentile and below 3.5 mm

From the 128 fetuses with NT < 3.5 mm, one (0.8%) case had a pathogenic CNV, four (3.1%) cases of non-reported pathogenic variant, one (0.8%) case of pathogenic autosomal recessive variant and 13 (10.2%) cases of VUS (Figure 1, Table 1).

NT thickness ≥ 3.5 mm

In 34 fetuses with NT ≥ 3.5 mm, an array-CGH was performed with the following results: four (11.8%) cases of pathogenic CNV, one (2.9%) case of non-reported pathogenic CNV, one (2.9%) case of pathogenic autosomal recessive CNV, and four (11.8%) cases of VUS (Figure 1, Table 1). Pathogenic CNV and VUS are described in table 2 and table 3, respectively.

Fetuses without structural abnormalities

At the first-trimester scan, 154 fetuses did not show any structural abnormality; from these, 3 (1.9%) had a pathogenic CNV, 5 (3.2%) had a non-reported pathogenic CNV, one (0.64%) had an autosomal recessive variant, and 16 (10.4%) cases had a VUS.

From the 126 fetuses with NT thickness < 3.5 mm and no structural abnormality, there was one (0.8%) case of pathogenic CNV, four (3.2%) cases of non-reported pathogenic variant, one (0.8%) case of pathogenic autosomal recessive variant and 13 (10.3%) cases of VUS.

Amongst the 28 cases with NT ≥ 3.5 mm and no structural abnormalities, we found two (7.1%) cases of pathogenic CNV, one (3.6%) case of non-reported pathogenic variant, and three (10.7%) cases of VUS (Figure 1, Table 1).

Combined test within the group of NT thickness between the 95th percentile and below 3.5 mm

In order to understand how the result of the combined test influenced the decision of undergoing an invasive test in the subgroup of NT > 95th percentile and < 3.5 mm, we decided to analyse these subgroup. From the 226 fetuses with NT between the 95th percentile and < 3.5 mm, 150 had a low risk at the combined test and 106

(70.7%) underwent an invasive test. Sixty-nine fetuses had a high risk, and 62 (90.0%) underwent an invasive test. Seven women declined combined test and 4 of these also declined an invasive test.

DISCUSSION

Main findings

For fetuses with an NT thickness above the 95th percentile and normal QF-PCR, the prevalence of pathogenic CNVs was 3.1%, despite large differences between fetuses with an NT thickness between the 95th percentile and 3.5 mm (0.8%) and those with NT \geq 3.5 mm (11.8%). In the absence of structural anomalies, the prevalence of pathogenic CNVs is reduced to 1.9%, 0.8% in foetuses with NT <3.5 mm and 7.1% in foetuses with NT \geq 3.5 mm.

Comparison with other studies

The association between increased NT and pathogenic CNVs has been extensively reported in the literature [11]. In fetuses with NT \geq 3.5 mm, there is a higher prevalence of pathogenic CNVs, as our study and many others have shown. The question is whether the NT cut-off point should be lowered to 3 mm or 95th percentile. Our series shows a 0.8% prevalence (1 out of 128) of pathogenic CNVs (95% CI, 0.0-4.9%) in fetuses with an NT thickness between the 95th percentile and 3.5 mm, regardless of the presence of structural abnormalities. Su *et al.* found a 1.7% prevalence (2 out of 119) in fetuses with an NT of 2.5-3.4 mm (95% CI, 0.3-6.5%), and Xue *et al.* found a 2.6% prevalence (3 out of 114) in fetuses with an NT between the 95th percentile and 3.5 mm (95% CI, 0.7-8.1%) [23, 24]. These figures are rather similar if we consider the size of the studies and the confidence intervals. Other studies that focused on fetuses with NT between 3.0 and 3.4 mm found a prevalence of pathogenic CNV between 0.4 and 2.1% [25–27].

In our study, the prevalence of VUS was 10%, which is higher than the figures reported by other authors (Xue 2.4%, Su 1.6%) [23, 24]. A possible explanation for this discrepancy is that in our study we included all VUS, regardless of whether or not they had been reported to the mother. Other studies may only have included those VUS and pathogenic variants that had been reported to women, which underestimates the real number of VUS, and may cause important discrepancies between studies. The number of invasive procedures is declining rapidly worldwide

with the growing implementation of cell-free DNA (cfDNA) testing [28, 29]. For pregnancies without ultrasound abnormalities, concerns have been raised, as submicroscopic pathogenic CNVs might be missed in cfDNA testing [30–32]. For fetuses with NT \geq 3.5 mm, most guidelines recommend performing an invasive test and array testing, and advice against cfDNA testing [22]. However, the indication for the group with NT between the 95th percentile and 3.5 mm remains unclear. Parents who face the decision between taking a cfDNA test or an invasive test should be informed that the chances of the baby having a pathogenic CNV are between 0.8% and 2.6% and this will be missed by cfDNA (it can only be reliably detected by CMA). In our study, 46 aneuploidies in 239 fetuses with increased NT were detected using QF-PCR. Performing QF-PCR has two purposes: to determine fetal sex before performing the CMA, and to reduce costs. This is so because QF-PCR allows to rule out the most frequent aneuploidies, thus avoiding array testing. One of the five reported pathogenic variants was not detected at karyotype resolution, which means an increased detection rate by 20% in fetuses with normal QF-PCR.

In the prenatal setting, it is an ethical challenge to report variants causing late-onset disorders, variants with reduced penetrance/variable expression (susceptible CNVs), and variants for which there is no information on possible consequences, i.e., VUS. There is no international consensus on guidelines for reporting these findings to future parents. However, some scientific associations have developed guidelines to spare anxiety to future parents and negative bias over a CNV with a highly uncertain outcome, which could potentially lead to stigma. For example, the BELgian PREnatal MicroArray (BEMAPRE) consortium recommends reporting only: a) sufficiently large variants with risk for a severe phenotype and/or associated with structural malformations; b) dominant late-onset clinically actionable diseases (therapeutic options, preventive measures, termination of pregnancy); c) carriership for autosomal recessive diseases with a carrier frequency $>1/50$; and d) X-linked carrier status [33]. Not all sites uniformly adopt these guidelines, and published studies on CMA performance may have missing CNV-related data if they are based only on clinical reports rather than original data. In our series, a significant proportion of pathogenic CNVs (Tables 2 and 3) were not reported, as per the Belgian guidelines, which increases the real pathogenic yield from 5 to 10 CNVs.

Interestingly, four CNVs were located at the chromosome 16p13.11 region (Table 3). One of the most frequent microdeletion/duplication syndrome, the 16p13.11 microdeletion, has been sporadically reported in fetuses with increased nuchal translucency [34]. Although the real prevalence of CNVs located at the 16p13.11 region in cohorts of fetuses with increased NT is unknown, our prevalence of 2.5% (4 in 162) is clearly higher than the prevalence of 1.2-4.4/10000 reported in controls [35, 36]. This raises the possibility that cohorts with an increased NT may have a higher prevalence of this pathogenic CNV, although it may not have always been reported [37, 38]. Most CNVs have very low population frequencies, and thus, published series, including the present, do not include enough women to determine with confidence if increased NT is also associated with a higher prevalence of other individual recurrent CNVs.

Strengths and limitations

It is common for both obstetricians and pregnant women to have doubts about the advisability of doing a genetic study in the NT subgroup between the 95th percentile and 3.5 mm. In many reference centers, the decision is based on the result of the combined test, but the evidence is not as solid as in the group with $NT \geq 3.5$ mm. A strength of this study is that it includes 128 fetuses in this subgroup, where the indication of the invasive test was influenced by the combined testing and not NT alone, which is more aligned with the clinical needs of many referral centers. The uptake of invasive testing was higher in women with high risk at the combined test (90%) compared to the low-risk group (70%).

. All CNVs (pathogenic, VUS and benign) were investigated in all cases but, following Belgian and English guides, only pathogenic CNVs were reported to women. Since there are not uniform international guidelines, variation between laboratory reporting policies exist. One strength of this study is that data are based in all CNVs detected, informed or not. This fact probably explains that our proportion of VUS is rather high, compared with other studies presumably based only on reported CNVs. Moreover, being a single-centre study, consistency in data collection from genetic and ultrasound tests and genetic counselling was facilitated. The study's main limitation is the high percentage of women (38%) in the NT group between the 95th percentile and 3.5 mm who did not undergo an invasive procedure or array testing. In this group, the decision to perform an invasive was based on the

combined risk, and for this reason, many women declined genetic testing. In the early years of the study, there was a heterogeneity of management in the subgroup of fetuses with NT between >95th percentile and <3.5 mm, as the array-CGH was not always performed, and it was introduced progressively in the clinical practice until 2017, when array-CGH testing was universally included in all invasive test.

CONCLUSION

In fetuses with NT above the 95th percentile, CMA allows the detection of submicroscopic anomalies that are not detected by karyotype testing, even in the absence of structural abnormalities or in cases with an NT thickness between the 95th percentile and 3.5 mm. Invasive testing with CMA should be discussed with the patients in these cases. Finally, increased NT may be associated with certain CNVs, as illustrated by 16p13.11 variants.

REFERENCES

1. Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, et al (2005) Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 192:1005–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.093>
2. Baer RJ, Norton ME, Shaw GM, et al (2014) Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *Am J Obstet Gynecol* 211:675.e1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.06.025>
3. Kagan KO, Sonek J, Kozlowski P (2022) Antenatal screening for chromosomal abnormalities. *Arch Gynecol Obstet* 305:825–835. <https://doi.org/10.1007/s00404-022-06477-5>
4. Hellmuth SG, Pedersen LH, Miltoft CB, et al (2017) Increased nuchal translucency thickness and risk of neurodevelopmental disorders. *Ultrasound Obstet Gynecol* 49:592–598. <https://doi.org/10.1002/uog.15961>
5. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al (2012) Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis. *N Engl J Med* 367:2175–2184. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203382>
6. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, et al (2011) Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37:6–14. <https://doi.org/10.1002/uog.7754>
7. de Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LCP, et al (2014) Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature: Genomic microarray testing in

- fetuses with structural anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43:139–146. <https://doi.org/10.1002/uog.12575>
8. Vestergaard EM, Christensen R, Petersen OB, Vogel I (2013) Prenatal diagnosis: array comparative genomic hybridization in fetuses with abnormal sonographic findings. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92:762–768. <https://doi.org/10.1111/aogs.12146>
 9. Egloff M, Hervé B, Quibel T, et al (2018) Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis in fetuses with isolated increased nuchal translucency: a French multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 52:715–721. <https://doi.org/10.1002/uog.18928>
 10. Ma Y, Pei Y, Yin C, et al (2019) Subchromosomal anomalies in small for gestational-age fetuses and newborns. *Arch Gynecol Obstet* 300:633–639. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05235-4>
 11. Grande M, Jansen F a. R, Blumenfeld YJ, et al (2015) Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 46:650–658. <https://doi.org/10.1002/uog.14880>
 12. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, et al (1998) UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet* 352:343–346. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)11280-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)11280-6)
 13. Kagan KO, Wright D, Valencia C, et al (2008) Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free beta-hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Hum Reprod* 23:1968–1975. <https://doi.org/10.1093/humrep/den224>
 14. Generalitat de Catalunya. Departamento de Salud (2008) Protocolo de diagnóstico prenatal de anomalías congénitas fetales. [Prenatal diagnosis protocol for fetal congenital anomalies], Primera edición. Direcció General de Salut Pública, Barcelona
 15. Wright D, Kagan KO, Molina FS, et al (2008) A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31:376–383. <https://doi.org/10.1002/uog.5299>
 16. Nicolaides KH (2011) Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 31:7–15. <https://doi.org/10.1002/pd.2637>
 17. Verma R, Babu A (1995) Human chromosomes. Principles and Techniques., McGraw-Hill. New York
 18. Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, et al (2001) Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod* 7:1001–1006. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.10.1001>
 19. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al (2011) American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 13:680–685. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182217a3a>

20. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al (2020) Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med* 22:245–257. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>
21. Vanakker O, Vilain C, Janssens K, et al (2014) Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet* 57:151–156. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.02.002>
22. Gardiner C, Wellesley D, Kilby MD, et al (2015) Recommendations for the Use of Chromosome Microarray in Pregnancy. London
23. Su L, Huang H, An G, et al (2019) Clinical application of chromosomal microarray analysis in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Mol Genet Genomic Med* 7:. <https://doi.org/10.1002/mgg3.811>
24. Xue S, Yan H, Chen J, et al (2020) Genetic Examination for Fetuses with Increased Fetal Nuchal Translucency by Genomic Technology. *Cytogenet Genome Res* 160:57–62. <https://doi.org/10.1159/000506095>
25. Hui L, Pynaker C, Bonacquisti L, et al (2021) Reexamining the optimal nuchal translucency cutoff for diagnostic testing in the cell-free DNA and microarray era: results from the Victorian Perinatal Record Linkage study. *Am J Obstet Gynecol* 225:527.e1-527.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.03.050>
26. Sagi-Dain L, Singer A, Ben Shachar S, et al (2021) Risk of Clinically Significant Chromosomal Microarray Analysis Findings in Fetuses With Nuchal Translucency From 3.0 mm Through 3.4 mm. *Obstet Gynecol* 137:126–131. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004195>
27. Petersen OB, Smith E, Van Opstal D, et al (2020) Nuchal translucency of 3.0-3.4 mm an indication for NIPT or microarray? Cohort analysis and literature review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 99:765–774. <https://doi.org/10.1111/aogs.13877>
28. Johnson K, Kelley J, Saxton V, et al (2017) Declining invasive prenatal diagnostic procedures: A comparison of tertiary hospital and national data from 2012 to 2015. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 57:152–156. <https://doi.org/10.1111/ajo.12590>
29. Kagan KO, Sonek J, Wagner P, Hoopmann M (2017) Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for chromosomal abnormalities. *Arch Gynecol Obstet* 296:645–651. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4459-9>
30. Srebniak MI, Knapen MFCM, Polak M, et al (2017) The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies. *Hum Mutat* 38:880–888. <https://doi.org/10.1002/humu.23232>

31. Konialis C, Pangalos C (2015) Dilemmas in Prenatal Chromosomal Diagnosis Revealed Through a Single Center's 30 Years' Experience and 90,000 Cases. *Fetal Diagn Ther* 38:218–232. <https://doi.org/10.1159/000368604>
32. Sotiriadis A, Papoulidis I, Siomou E, et al (2017) Non-invasive prenatal screening versus prenatal diagnosis by array comparative genomic hybridization: a comparative retrospective study. *Prenat Diagn* 37:583–592. <https://doi.org/10.1002/pd.5051>
33. Muys J, Blaumeiser B, Jacquemyn Y, et al (2018) The Belgian MicroArray Prenatal (BEMAPRE) database: A systematic nationwide repository of fetal genomic aberrations. *Prenat Diagn* 38:1120–1128. <https://doi.org/10.1002/pd.5373>
34. Law LW, Lau TK, Fung TY, et al (2009) De novo 16p13.11 microdeletion identified by high-resolution array CGH in a fetus with increased nuchal translucency. *BJOG* 116:339–343. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01948.x>
35. Paciorkowski AR, Keppler-Noreuil K, Robinson L, et al (2013) Deletion 16p13.11 uncovers NDE1 mutations on the non-deleted homolog and extends the spectrum of severe microcephaly to include fetal brain disruption. *Am J Med Genet A* 161A:1523–1530. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35969>
36. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJB, et al (2013) Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* 8:e61365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061365>
37. Maya I, Yacobson S, Kahana S, et al (2017) Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis: NT and CMA. *Ultrasound Obstet Gynecol* 50:332–335. <https://doi.org/10.1002/uog.17421>
38. Maya I, Basel-Salmon L, Singer A, Sagi-Dain L (2020) High-frequency low-penetrance copy-number variant classification: should we revise the existing guidelines? *Genet Med* 22:1276–1277. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0795-4>

Statements and declarations

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Authors' contributions

E Coello Cahua: Protocol development, Data collection or management, Data analysis, Manuscript writing/editing

MA Sánchez-Durán: Protocol development, Data collection or management, Data analysis, Manuscript writing/editing

I Calero: Data collection or management, Manuscript writing/editing

MT Higuera: Data collection or management, Manuscript writing/editing

M Avilés-García: Data collection or management, Manuscript writing/editing

C Rodó: Data collection or management, Manuscript writing/editing

N Maiz: Data collection or management, Data analysis, Manuscript writing/editing

A Plaja Rustein: Data collection or management, Manuscript writing/editing

N Castells Sarret: Data collection or management, Manuscript writing/editing

C Mediano Vizuettt: Data collection or management, Manuscript writing/editing

E Carreras: Manuscript writing/editing

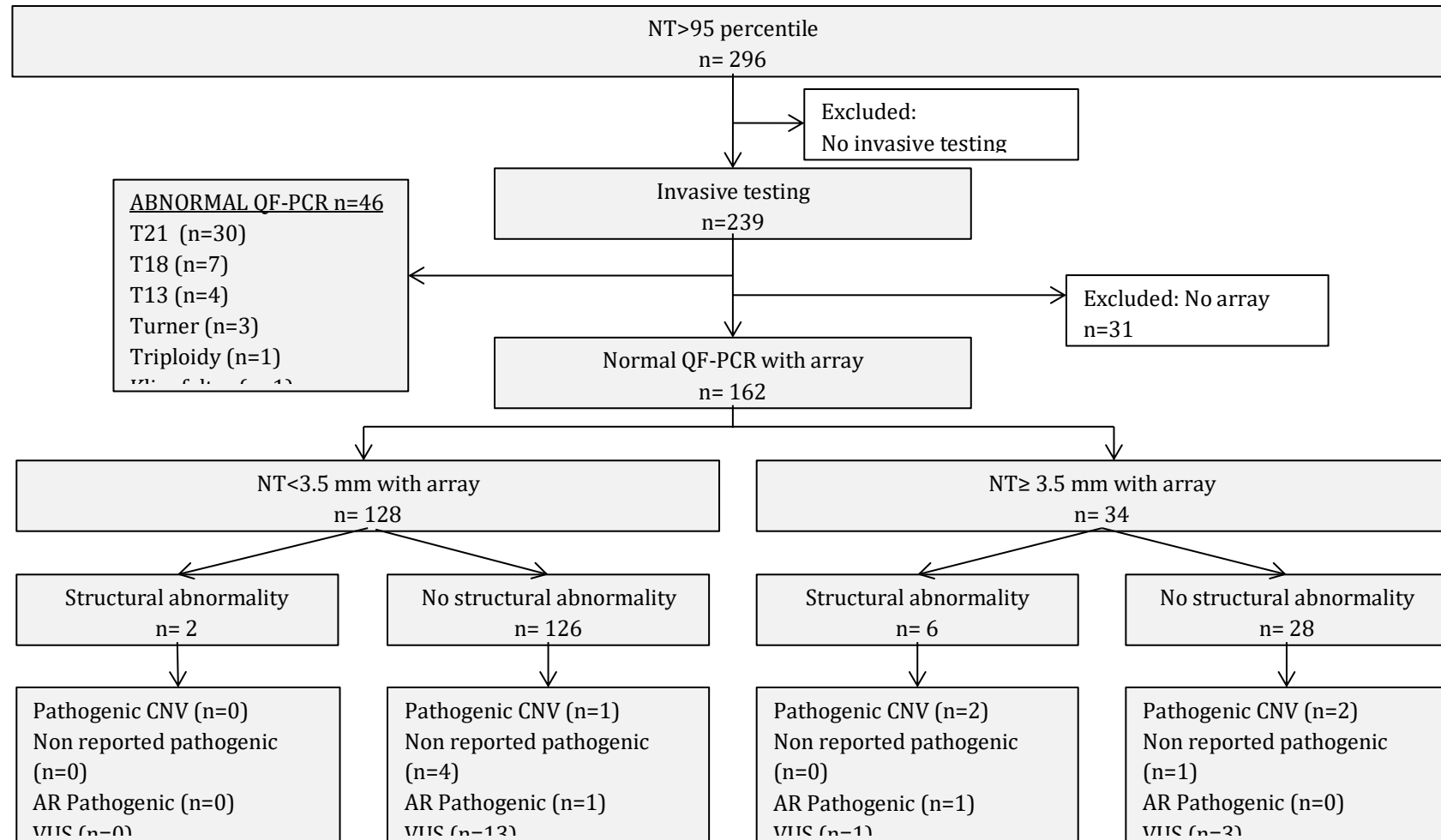
Ethics approval

This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki.

The study was approved by the institutional research ethics committee of Vall d'Hebron University Hospital (CEIC-VHIR), PR(AMI)408/2019 on November 22nd 2019.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Flowchart showing the QF-PCR and array results in fetuses with nuchal translucency thickness between >95 percentile and <3.5 mm, and those with NT \geq 3.5 mm.



NT: nuchal translucency. T13: trisomy 13. T18: trisomy 18. T21: trisomy 21. AR: autosomal recessive

table 1. Array-CGH results reported according to NT thickness and presence/absence of structural abnormalities in fetuses with normal QF-PCR.

	N	Pathogenic CNV		Non-reported CNV		Autosomal recessive CNV		VUS	
		n (%)	95%CI	n (%)	95%CI	n (%)	95%CI	n (%)	95%CI
All	162	5 (3.1)	1.1-7.4	5 (3.1)	1.1-7.4	2 (1.2)	0.2-4.9	17 (10.4)	6.4-16.5
NT 95-99 th percentile	128	1 (0.8)	0.0-4.9	4 (3.1)	1.0-8.3	1 (0.8)	0.04-4.9	13 (10.1)	5.7-17.1
NT >99 th percentile	34	4 (11.8)	3.8-28.4	1 (2.9)	0.1-17.1	1 (2.9)	0.1-17.1	4 (11.8)	3.8-28.4
No structural abnormality	154	3 (1.9)	0.5-6.0	5 (3.2)	1.2-7.8	1 (0.6)	0.0-4.1	16 (10.4)	6.2-16.6
NT 95-99 th percentile	126	1 (0.8)	0.0-5.0	4 (3.2)	1.0-8.4	1 (0.8)	0.0-5.0	13 (10.3)	5.8-17.3
NT >99 th percentile	28	2 (7.1)	1.2-25.0	1 (3.6)	0.2-20.2	0		3 (10.7)	2.8-29.4
Structural abnormality	8	2 (25)	4.5-64.4	0		0		1 (12.5)	0.7-53.3
NT 95-99 th percentile	2	0		0		0		0	
NT >99 th percentile	6	2 (33.3)	6.0-75.9	0		1 (16.7)	0.9-63.5	1 (16.7)	0.9-63.5

CGH = comparative genomic hybridization; NT = nuchal translucency; QF-PCR = quantitative fluorescence-polymerase chain reaction; CNV = copy number variant, VUS = variant of unknown significance; CI = confidence interval.

Table 2: Pathogenic copy number variants (CNVs) detected in fetuses with increased nuchal translucency

Case Number	NT (mm)	Structural malformations	Array-CGH results	Size (Mb)	Visible by cytogenetics	Known syndrome Patients phenotype	Pregnancy outcome, gestational age
1	4.4	None	arr[GRCh37] 2p25.3 p25.1(21191_11179952)x3, 9p24.3 p22.2(204090_17817087)x1	11.2, 17.6	Yes	Der(2;9)(p25.1;p22.2)	TOP, 14 weeks
2	7.0	Hypoplastic left heart syndrome; micrognathia	arr[GRCh37] 10q24.1q26.3(97645096_132789683)x3	35.14	Yes	Distal trisomy 10q syndrome. Duplication also includes SHFM3, associated with an increased risk of Split hand/foot malformation.	TOP, 14 weeks
3	9.3	None	arr[GRCh37] 3q24q29(143375759_197837069)x3	54.46	Yes	46,XX,+der(21)t(3;21)(q23;p11.2)mat. Includes 3q29 duplication syndrome.	TOP, 13 weeks
4	3.4	None	arr[hg19] 22q11.21(18661725-21561514)x3	2.84	No	22q11.2 microduplication syndrome	Alive, 39 weeks
5	9.0	Mitral-aortic hypoplasia	arr[GRCh37] 4p16.3p15.1(75647_35238188)x1, 4p15.2 p15.1(25428634_33080393)x1	35.16, 7.65	Yes*	Wolf-Hirschhorn syndrome	TOP, 14 weeks

*it is a complex anomaly in which the deletion 4p16.3p15 is visible, but the deletion 4p15.2p15.1 is not.

NT = nuchal translucency; CGH = comparative genomic hybridization; TOP = termination of pregnancy

Table 3: Non-reported pathogenic copy number variants (CNVs) detected in fetuses with increased nuchal translucency

Case number	NT (mm)	Structural malformations	Array-CGH results	Size (Mb)	Visible by cytogenetics	Known syndrome Patients phenotype	Pregnancy outcome, gestational age
6	4.1	None	arr[GRCh37] 16p13.11(15551062_16194575)x1	0.64	No	Recurrent 16p13.11 deletion (MYH11)	Alive, 39 weeks
7	2.9	None	arr[GRCh37] 16p13.11p12.3(15404476_18631990)x3	3.23	No	Recurrent 16p13.11 duplication (MYH11)	Alive, 37 weeks
8	3.1	None	arr[GRCh37] 16p13.11(14910213_16194575)x1	1.28	No	Recurrent 16p13.11 deletion (MYH11)	Outcome missing
9	2.8	None	arr[GRCh37] 16p12.2(21959950_22517094)x1	0.56	No	Recurrent 16p12.1 deletion (CDR2)	Alive, 39 weeks
10	2.7	None	arr[GRCh37] 15q11.2(20750094_23217513)x1	2.47	No	Recurrent 15q11.2 deletion (NIPA1)	Alive, 38 weeks

NT = nuchal translucency; CGH = comparative genomic hybridization; TOP = termination of pregnancy