



FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE

Escuela de Medicina

Tests Genéticos en el Diagnóstico Prenatal

Dra. Marcela Lagos
Unidad de Biología Molecular y Citogenética
Departamento de Laboratorios Clínicos
Pontificia Universidad Católica de Chile

Test prenatales

SCREENING

DIAGNÓSTICO

Screening
en suero

Screening
en suero +
Ultrasonido

PPNI

CVS

Líquido
amniótico

Cariotipo

FISH

aCGH

SCREENING/TAMIZAJE

Riesgo: análisis bioquímico y estadísticas poblacionales

DIAGNÓSTICO

Resultados en base a test genéticos

Muestras (test diagn3sticos)

Vellosidades coriales

- Procedimiento: CVS (chorionic villus sampling), biopsia de vellosidades coriales
- Despu3s de las 10-11 semanas hasta las 13-14
- Riesgos

L3quido amni3tico

- Procedimiento: amniocentesis
- Desde las 15 semanas
- Riesgos

Sangre fetal

- Procedimiento: cordocentesis
- Desde las 15 semanas
- Riesgos

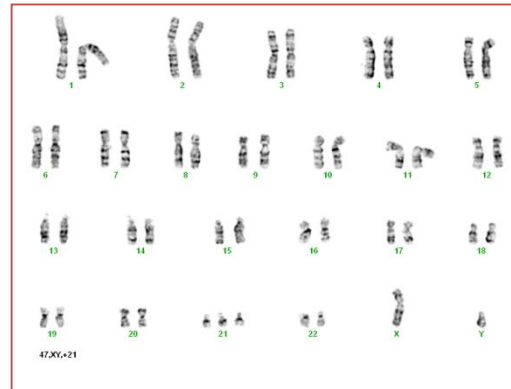
Clasificación de las mutaciones (variantes patogénicas)

- Clasificación por tamaño (otras clasificaciones son por consecuencias en la expresión génica)
- Conceptualmente útil

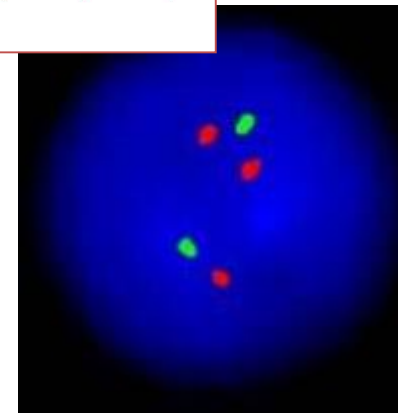
Tipo	Frecuencia	Ejemplo
Genómicas o cromosómicas	1 cada 25 a 50 meiosis	aneuploidías
Cromosómicas estructurales o regionales	1 cada 1700 divisiones celulares	deleciones
Génicas	1 cada 10.000.000 bp	sustituciones

Alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidias euploidia)

- tradicional: cariotipo



- más recientes: FISH



- nuevos: a nivel molecular: QF-PCR
MLPA

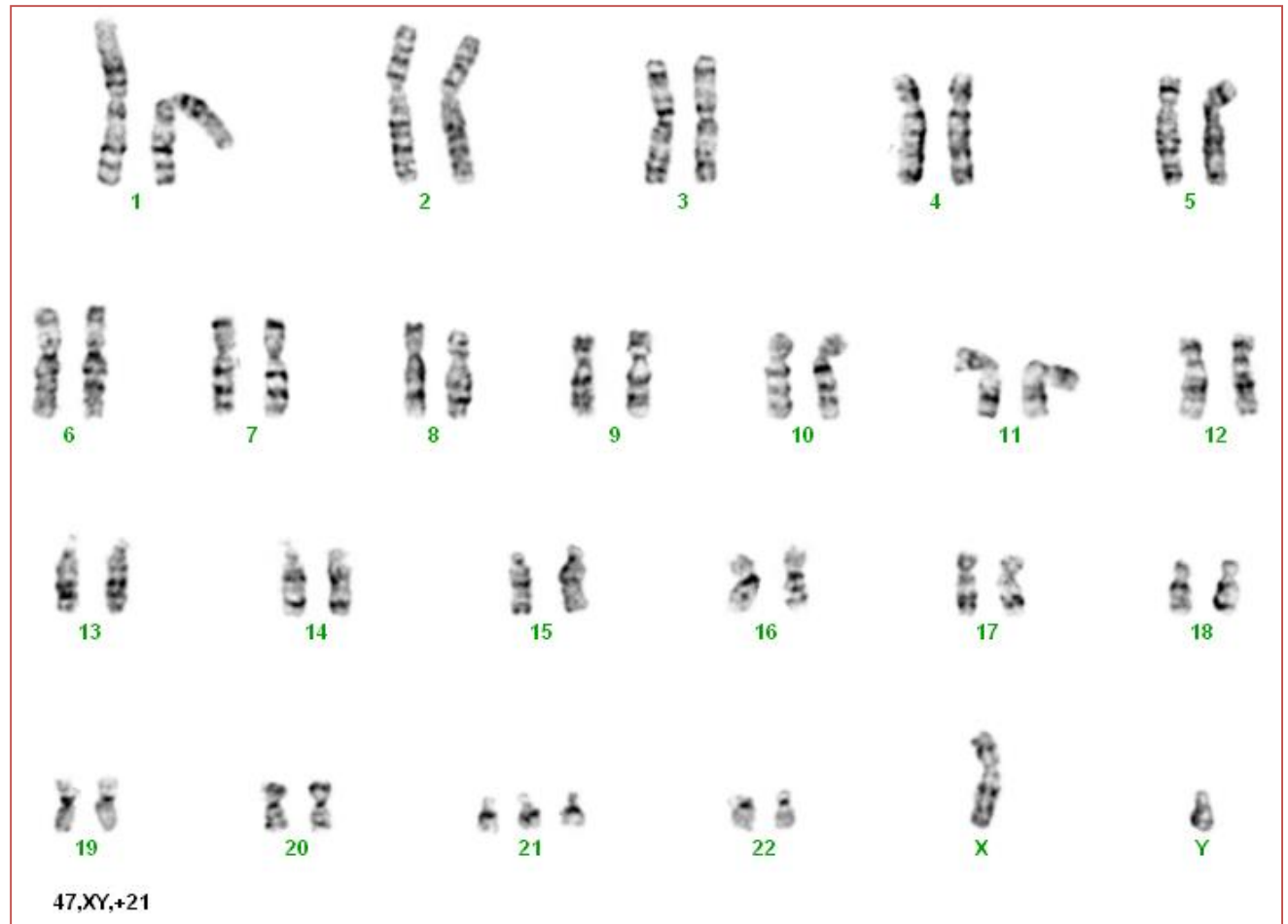
Mutaciones Genómicas

Alteración del número de cromosomas en la célula: **ANEUPLOIDIA**

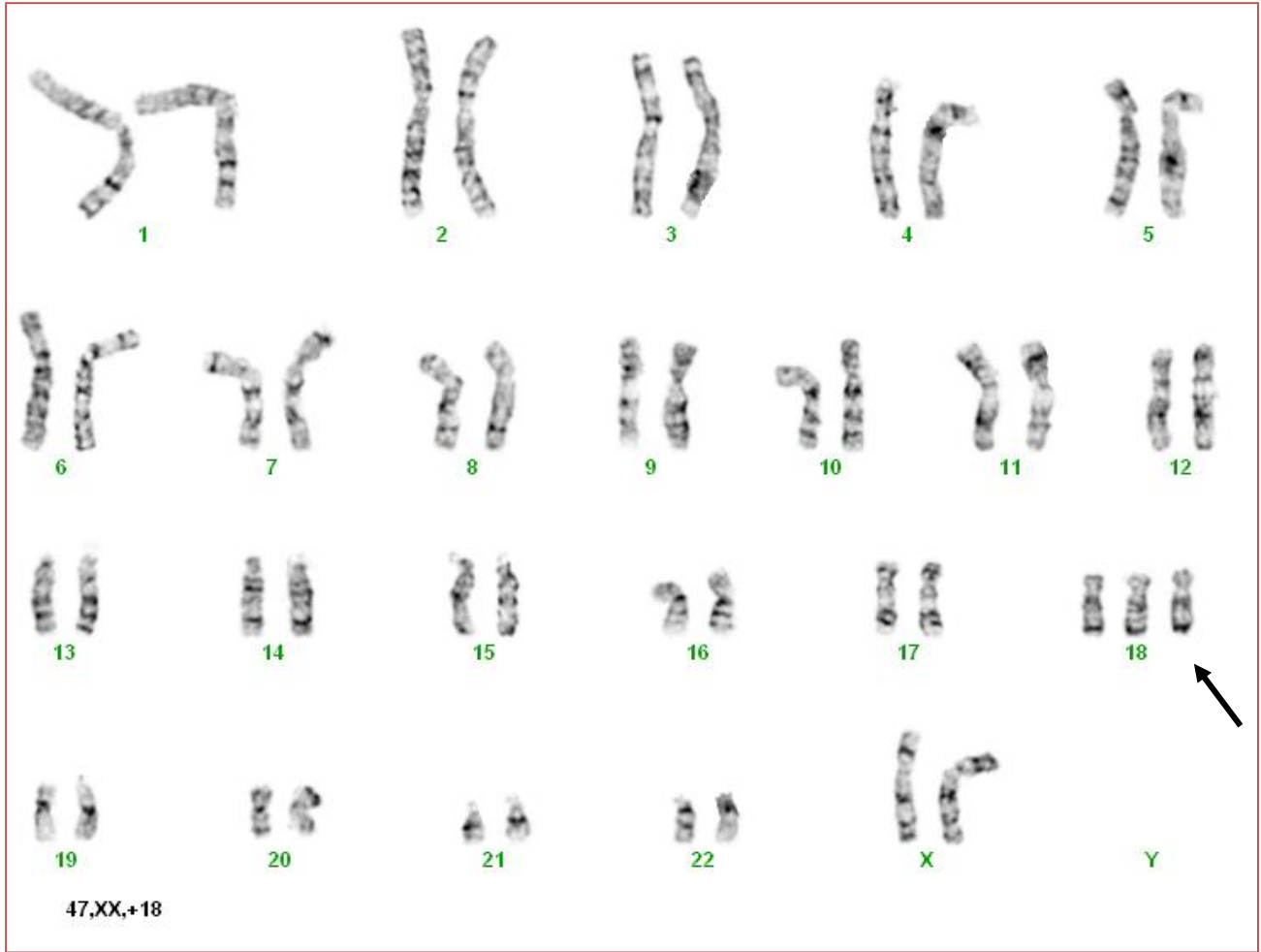
Aumento o disminución del número de cromosomas

- Un cromosoma

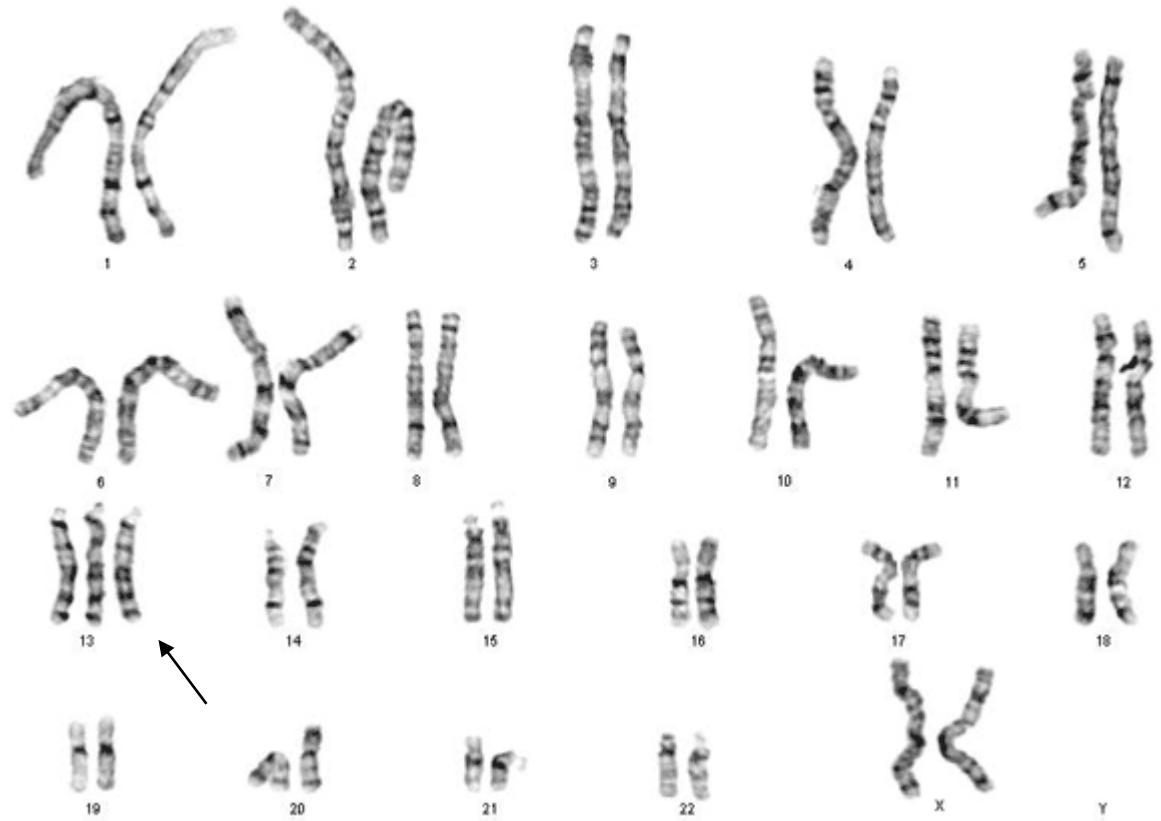
Trisomía 21 (47,XY,+21)



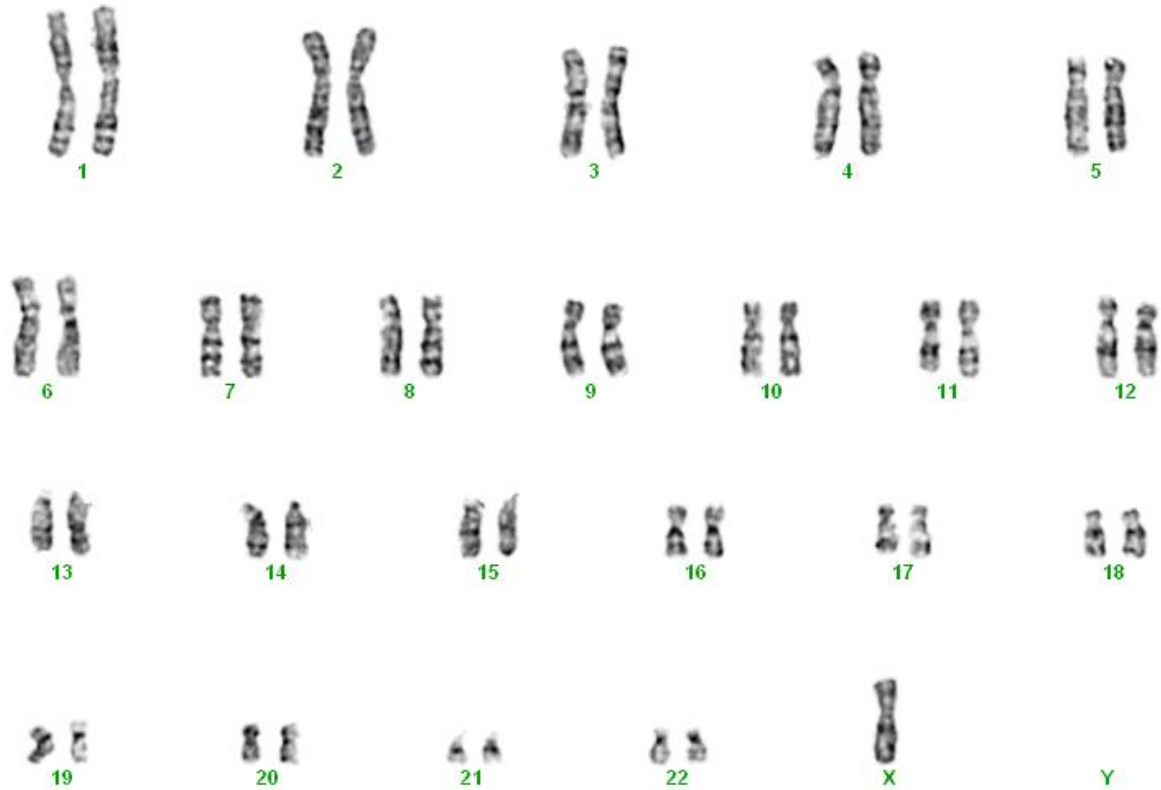
Trisomía 18 (47,XX,+18)



Trisomy 13



Monosomía X (45,X)



Mutaciones Genómicas

Alteración del número de cromosomas en la célula: **EUPLOIDIA**

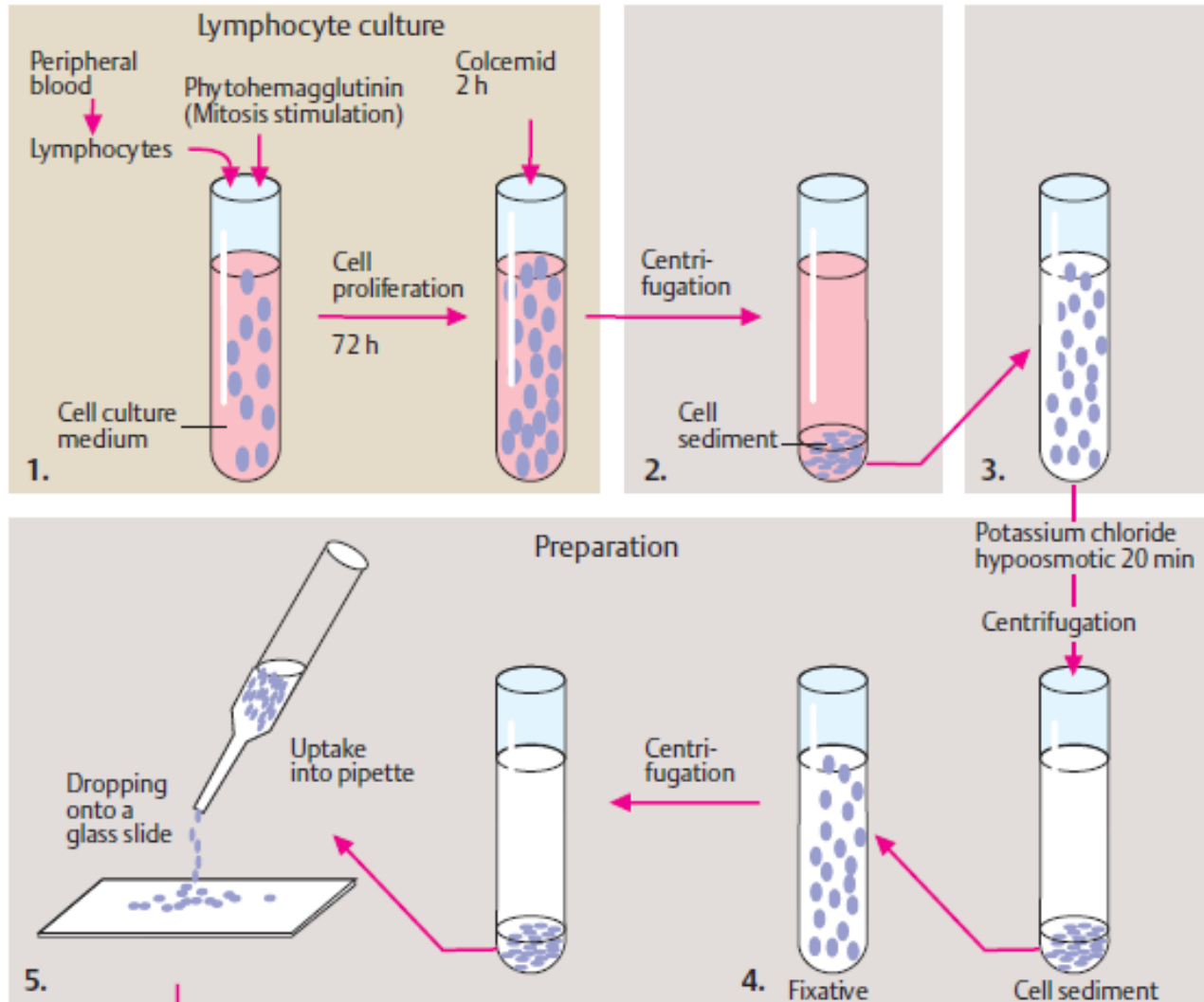
Aumento o disminución del número de cromosomas

- Set completo (tri-tetraploidías)

Triploidía (69,XXX)



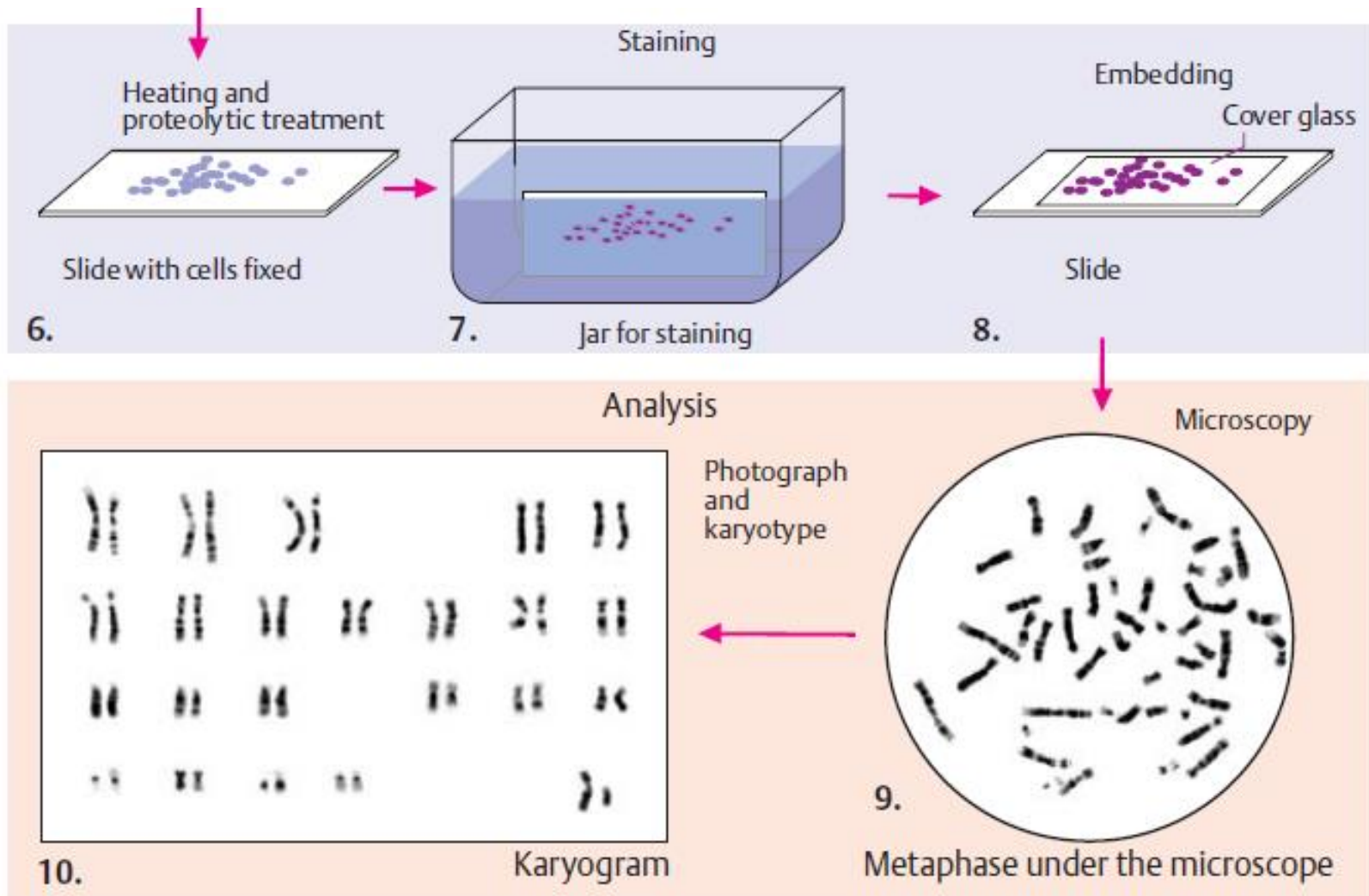
Cultivo linfocitos



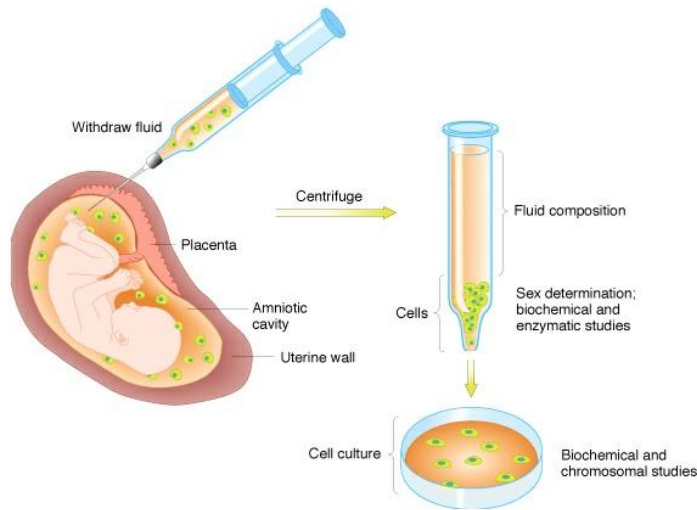
- Colchicina:
- arresto mitótico
 - disolución del huso

- Solución hipotónica:
- Calidad de metafases

Cultivo linfocitos



Cariotipo en muestra de líquido amniótico



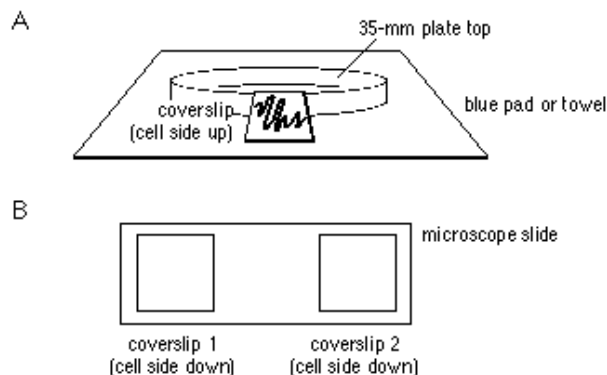
- Cultivo: 7- 14 días
- Células fetales de la piel, tracto digestivo y urinario
- Gold standard

Ventajas:

- Todas los cromosomas
- Mosaicos > de (25%)

Desventajas:

- Tiempo de respuesta
- Mosaicos bajos



Cariotipo en muestra de sangre

- Cultivo 72 horas, luego...
- En urgencias 48 horas
- Gold standard

Ventajas:

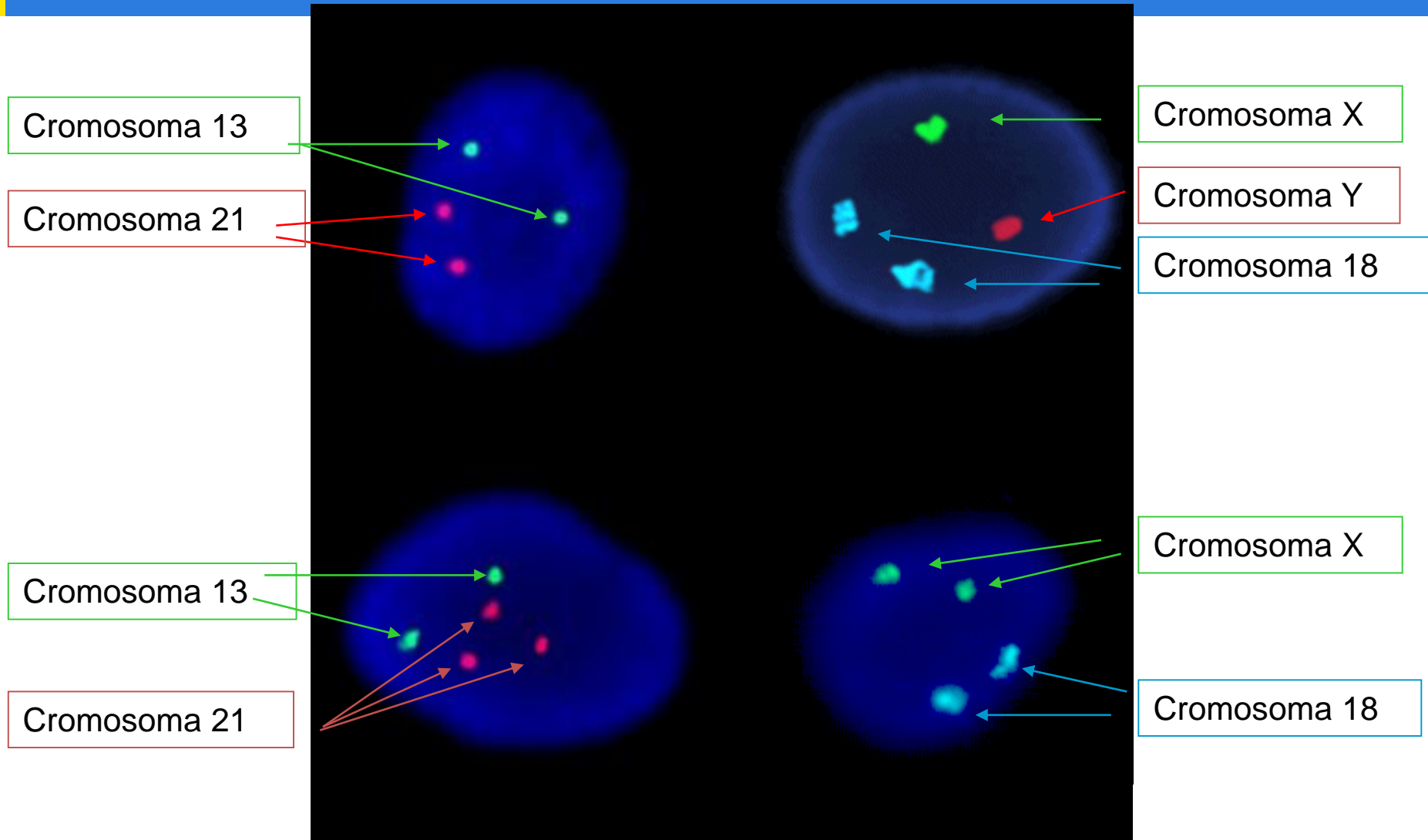
- Todas los cromosomas
- Identificación exacta del tipo de alteración
- Mosaicos > de

Desventajas:

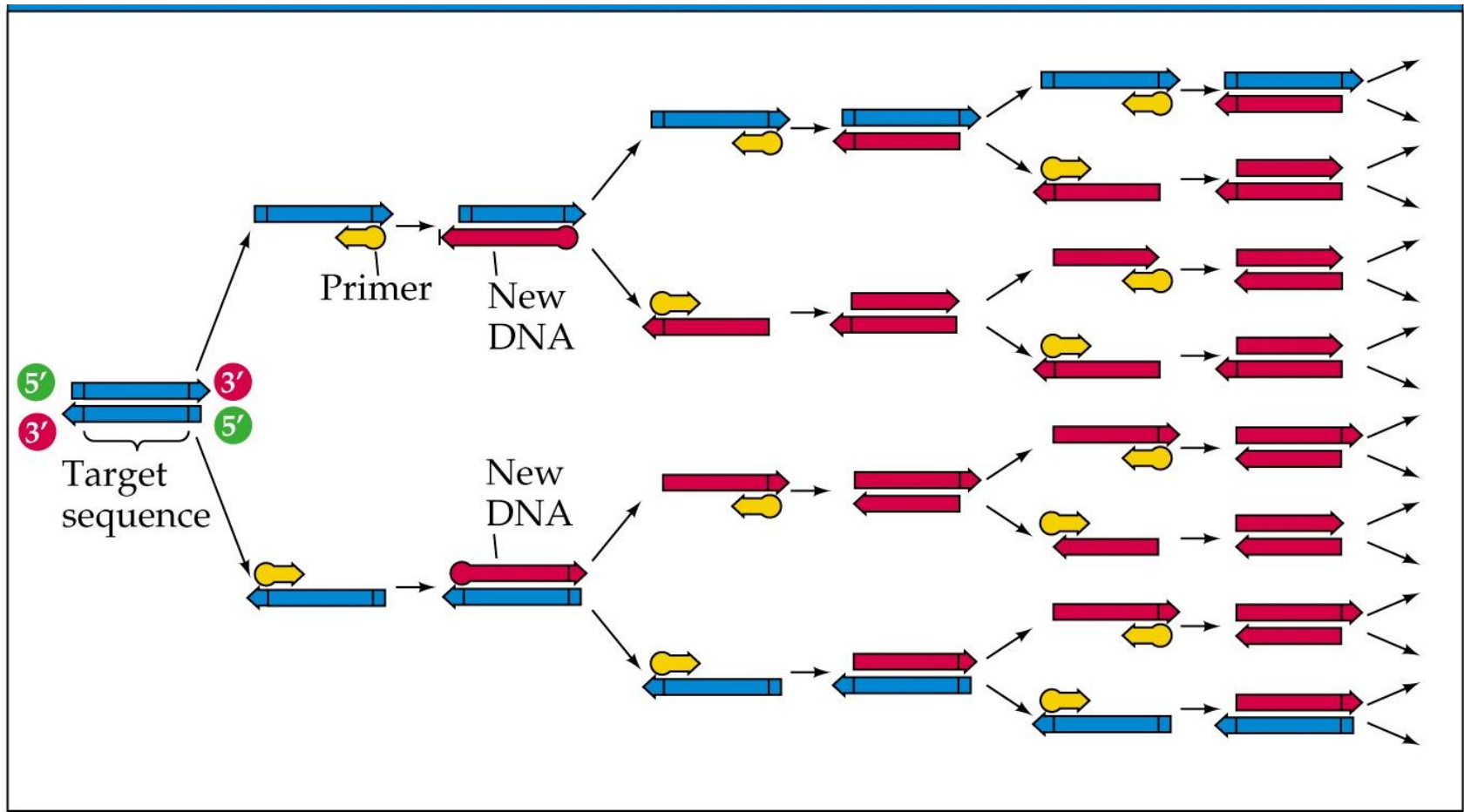
- Tiempo de respuesta
- Mosaicos bajos

FISH núcleos interfásicos

Detección de aneuploidías (trisomía 21)

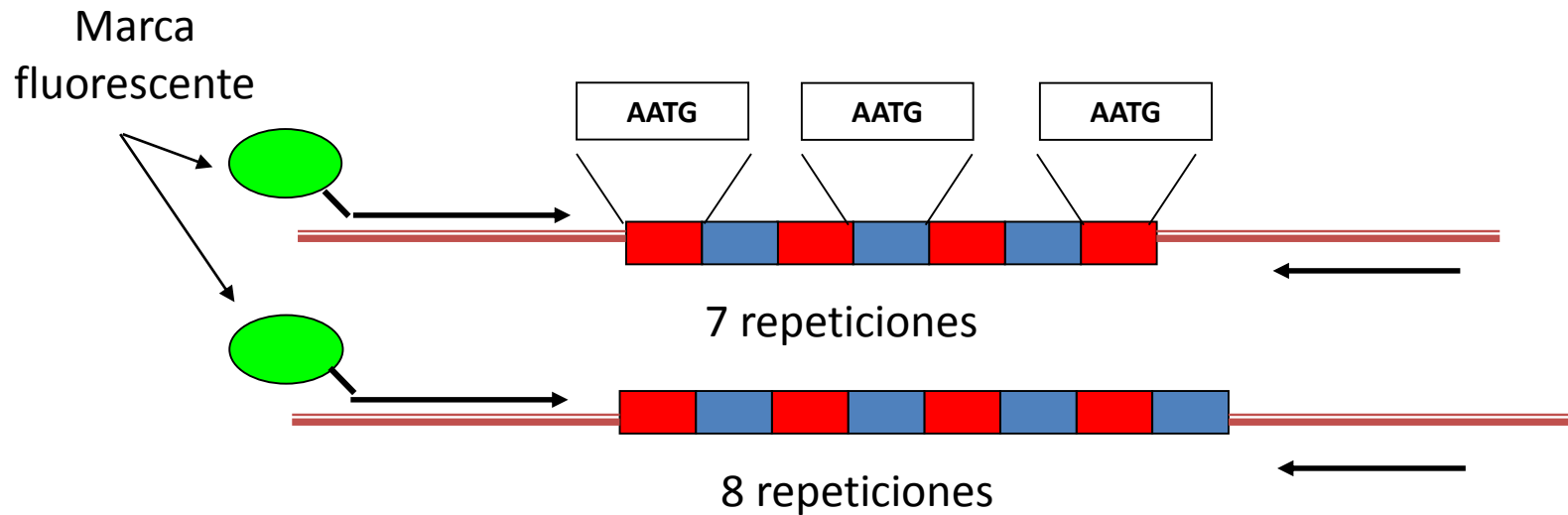


Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



QF-PCR

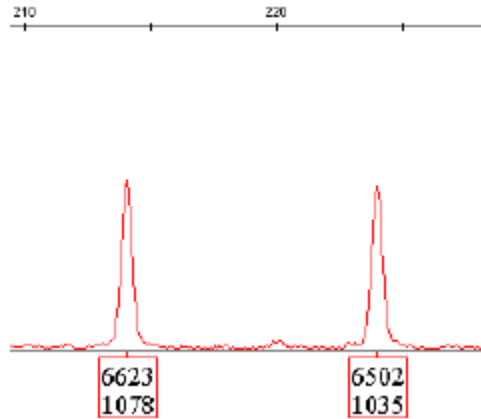
Estudio de regiones polimórficas cortas, repetidas en tandem



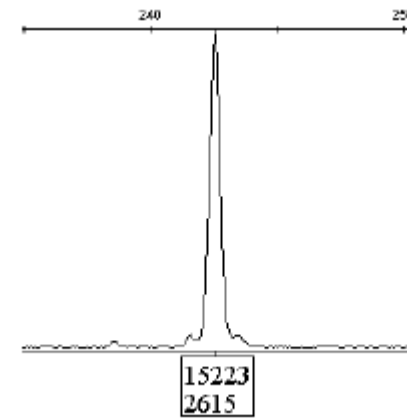
- Regiones altamente polimórficas (STR) con 15 a 20 alelos en cada locus
- Aplicación: diagnóstico de aneuploidías (13,18,21, X e Y)

Resultados

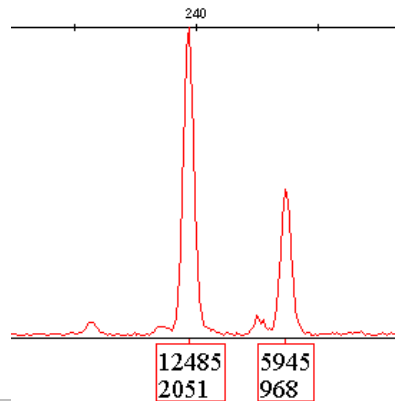
Disomía normal



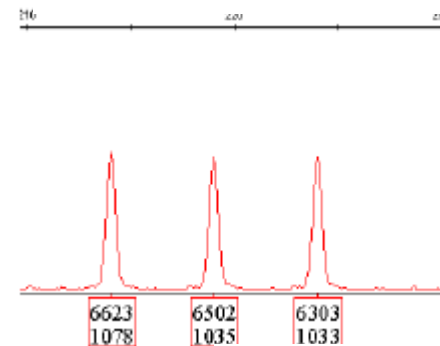
Homocigoto



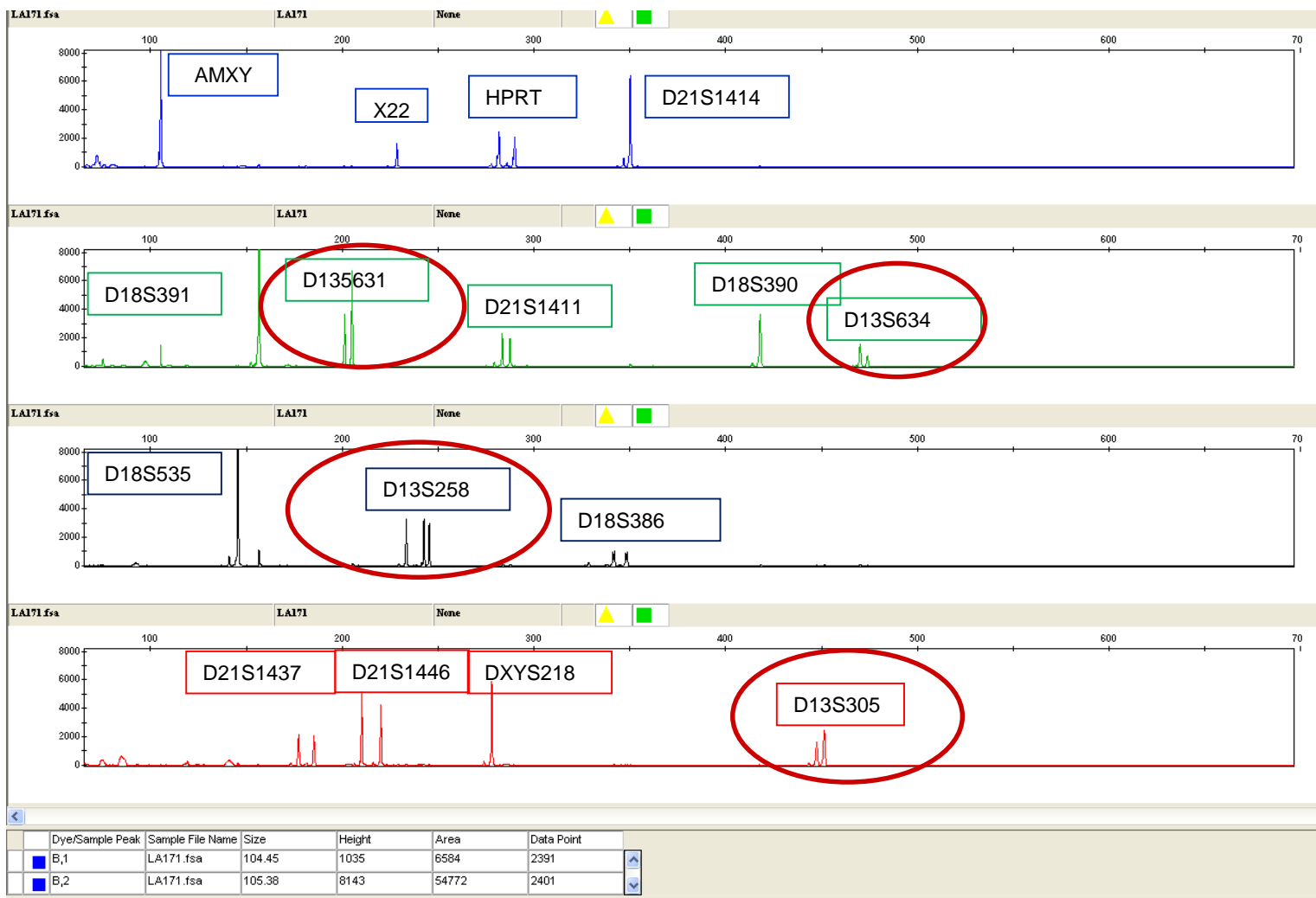
Trisomía dialélica



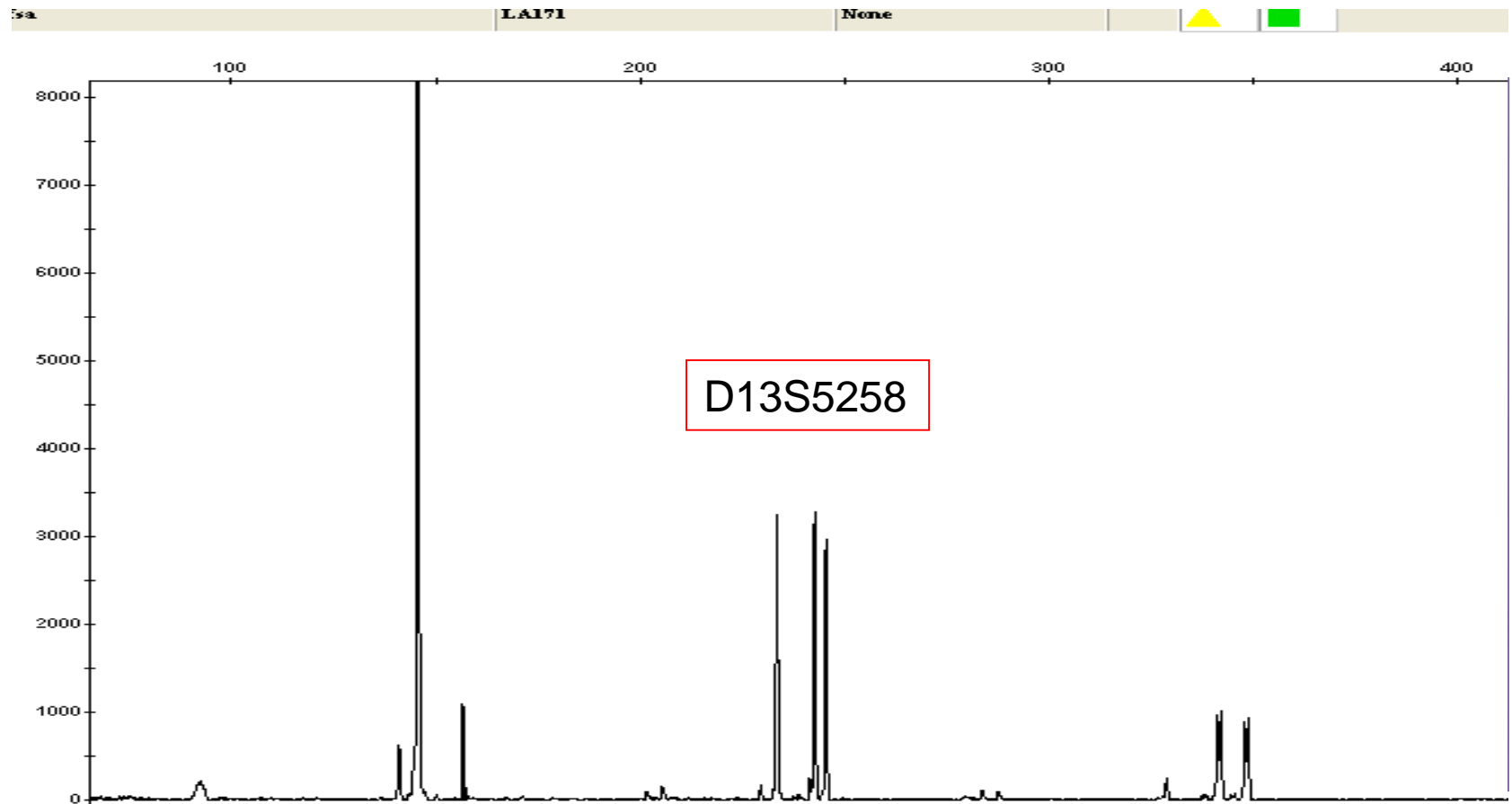
Trisomía trialélica



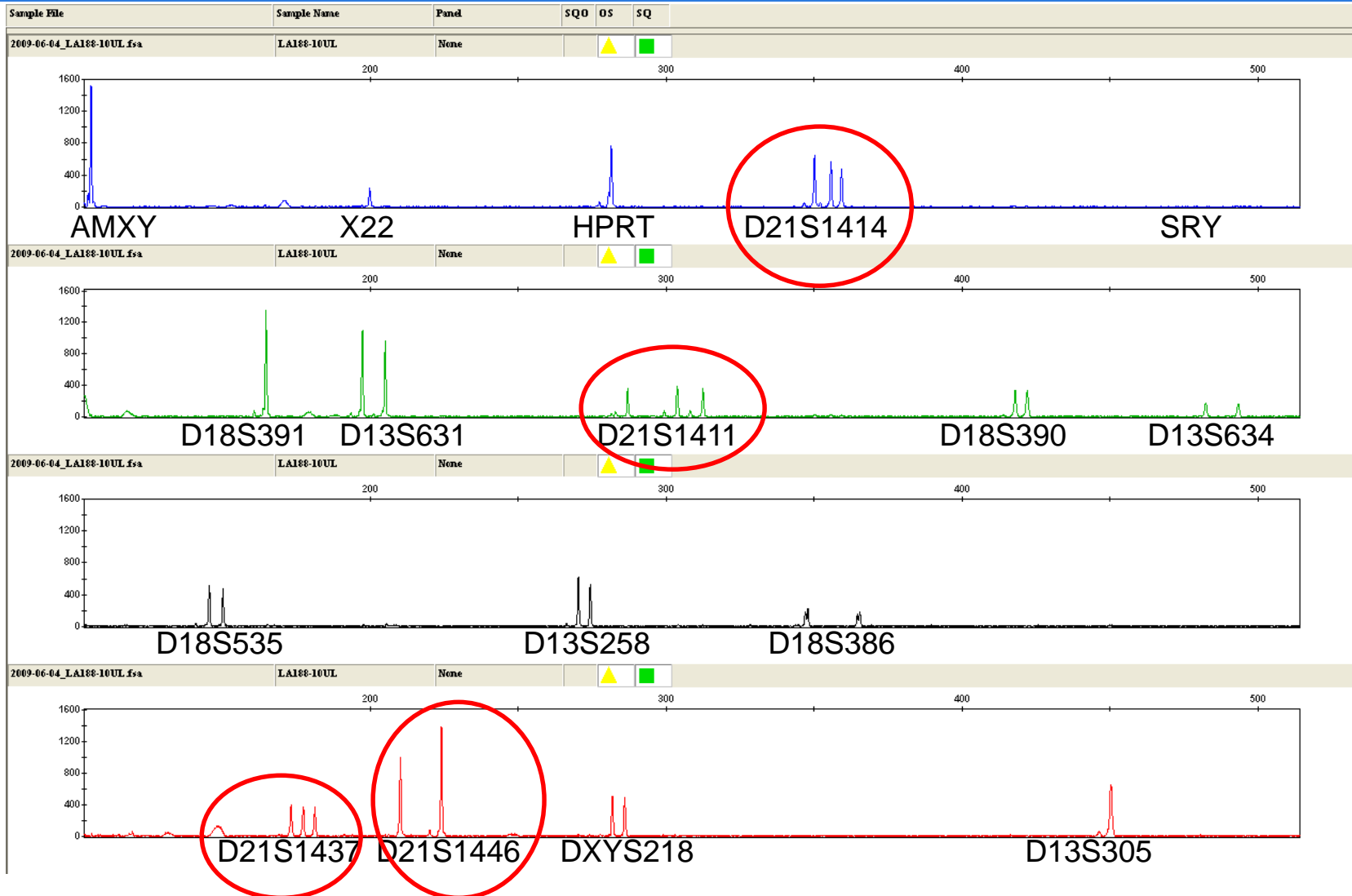
QF-PCR



Trisomía 13 por QF-PCR en LA



Trisomía 21 por QF-PCR en LA



Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

1. Denaturation and Hybridization

PCR primer sequence X



Hybridization sequence (left)

Hybrid



2. Ligation

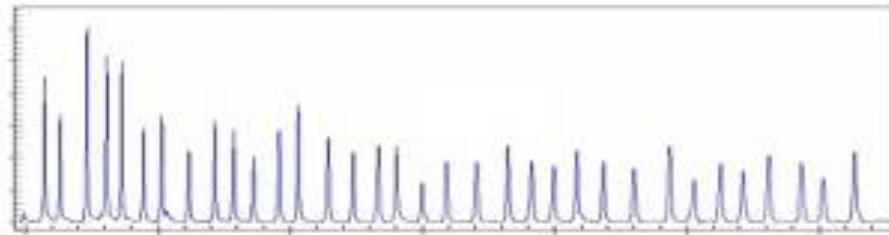


3. PCR with universal primers X and Y

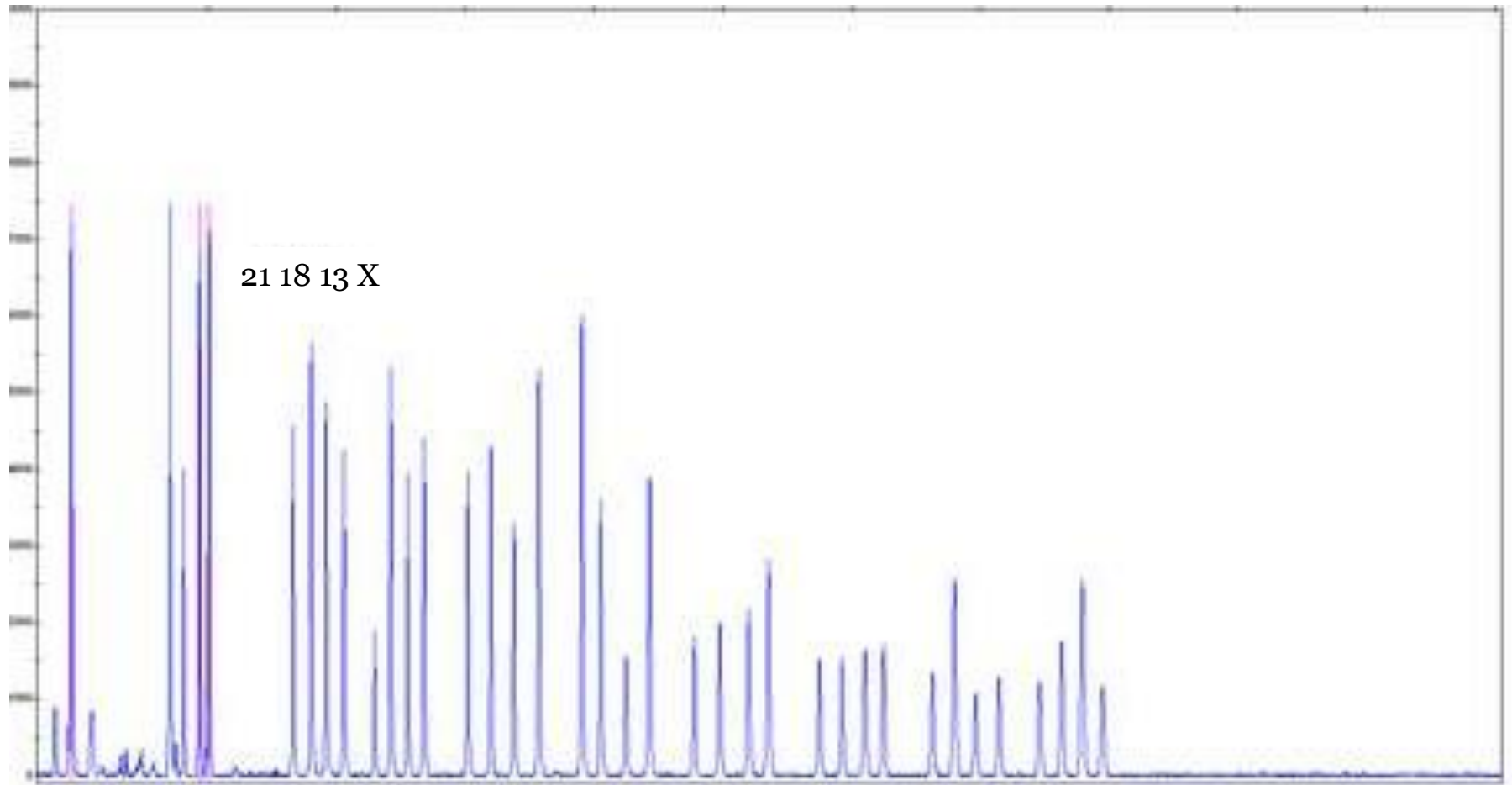
exponential amplification of ligated probes only



4. Fragment analysis

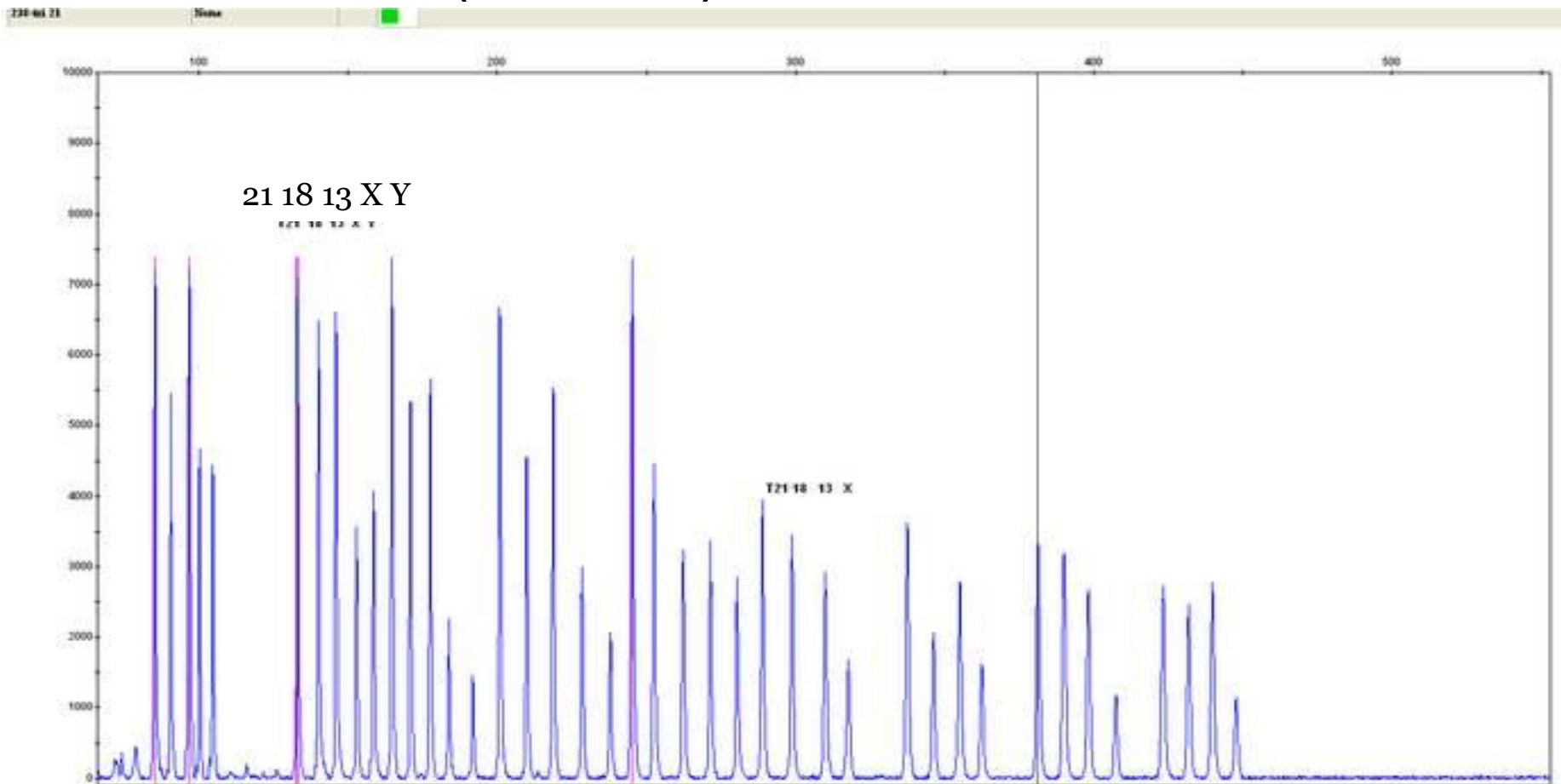


MLPA



MLPA

- Trisomía 21 (XY,+21)



QF PCR y MLPA

Tests de screening, debe confirmarse con cariotipo u otro

Ventajas:

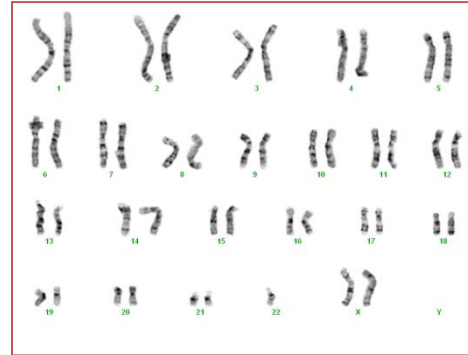
- Rapidez
- Automatización
- Menos operadores
- Sensibilidad → menos muestra
- Especificidad alta

Desventajas

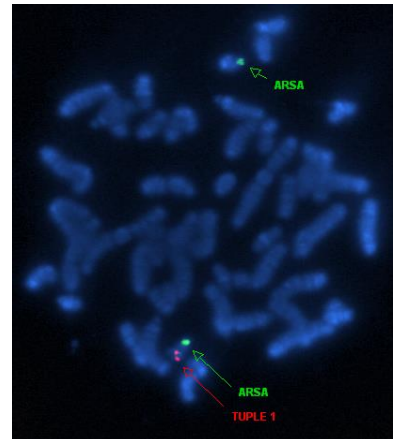
- Mosaicos < 20-30%

Alteraciones cromosómicas estructurales

- tradicional: cariotipo

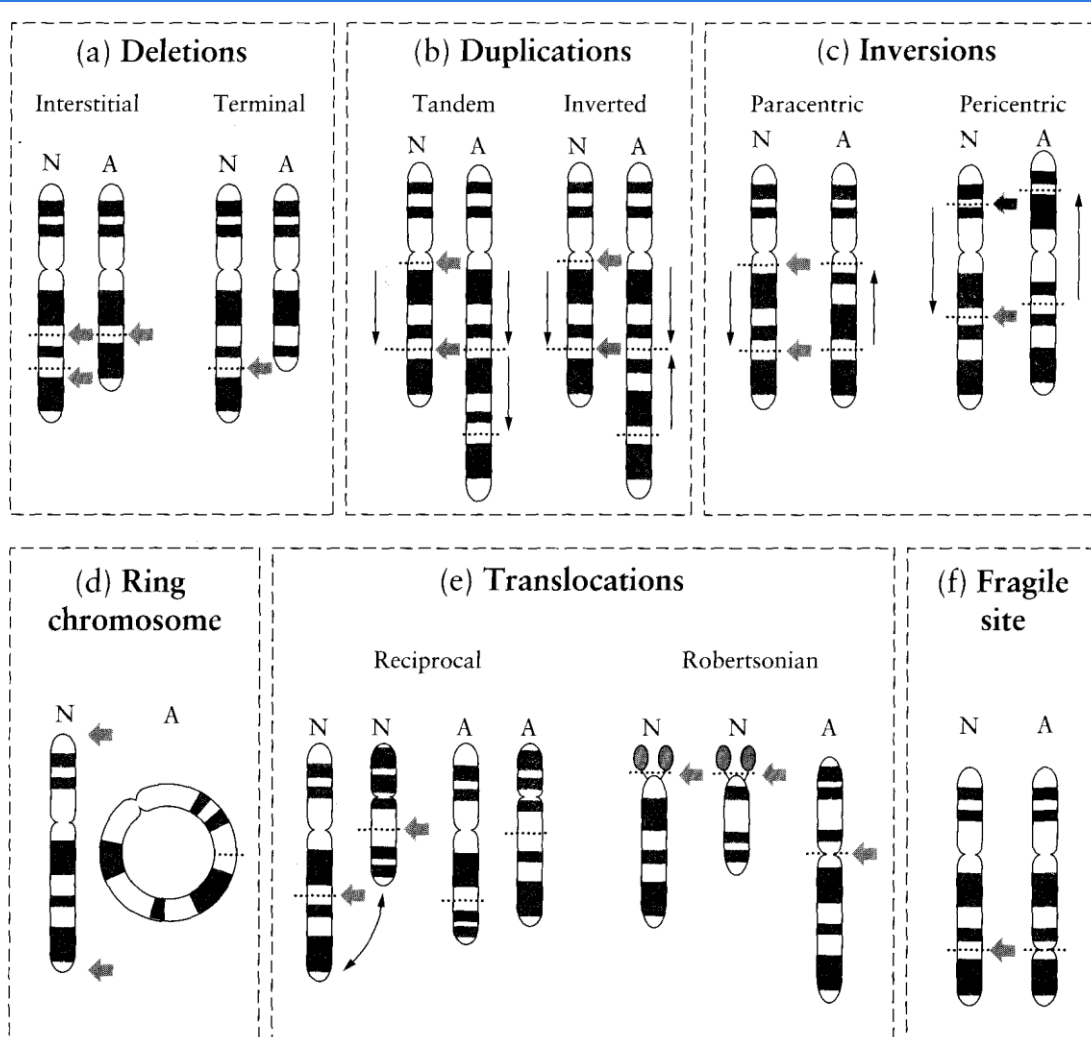


- más recientes: FISH



- nuevos: estudios moleculares: CGH (array)

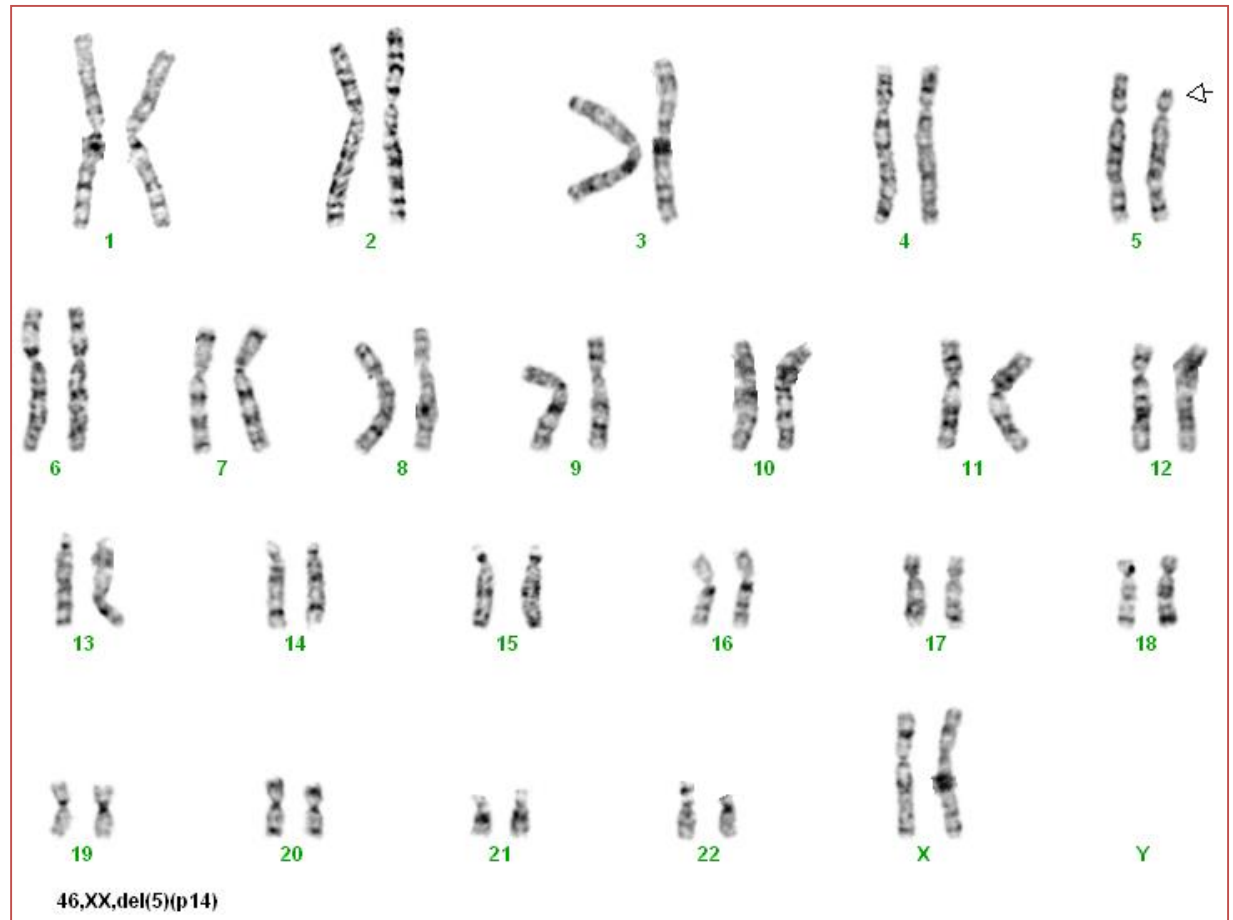
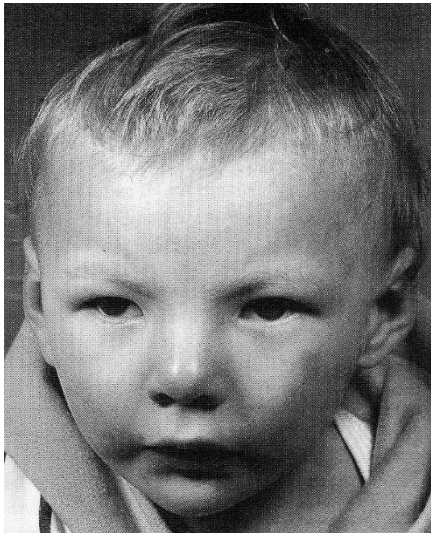
Alt. Estructurales (cromosómicas)



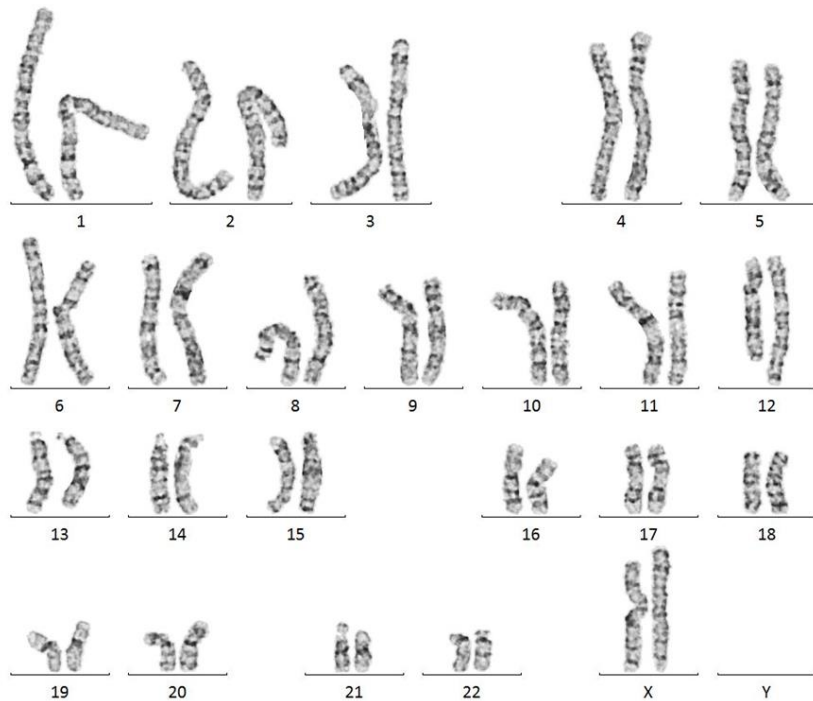
Alteración de la estructura de uno o más cromosomas en la célula
Altera expresión de cientos de genes

Deleción 5p 46,XX,del(5)(p14) Sd Cri du Chat

- Deleción terminal 5p15
- Llanto como gato
- Retraso mental

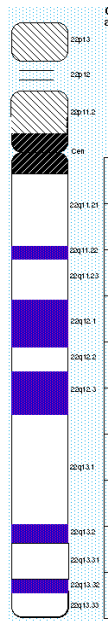


Cariotipo



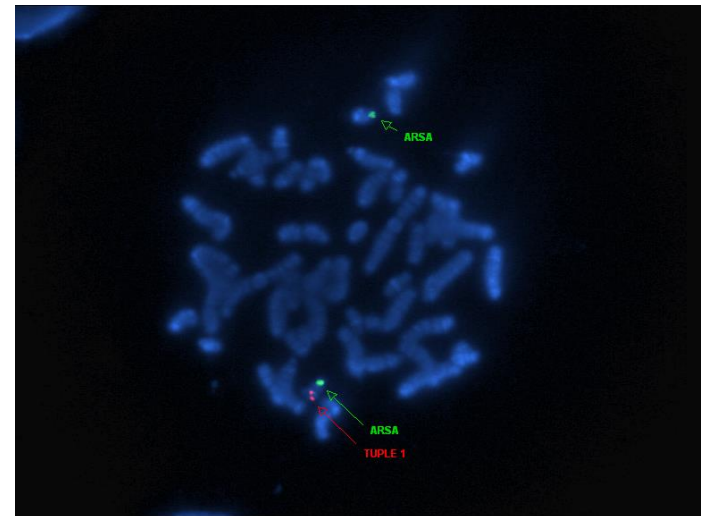
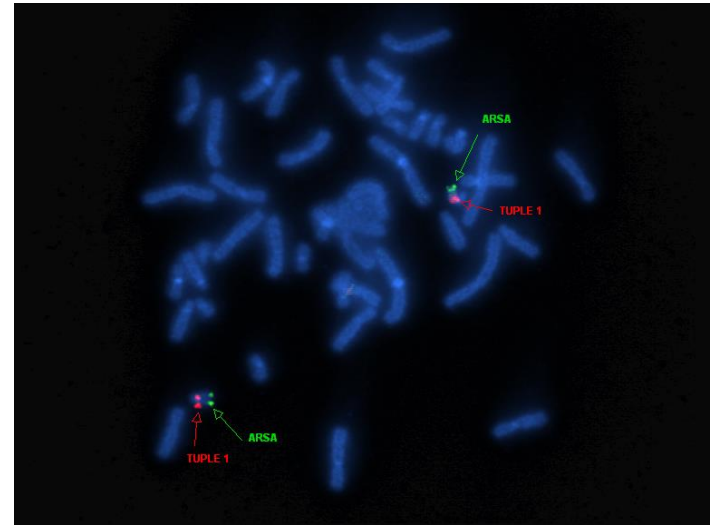
Sensibilidad
alteraciones
estructurales $> 5-10$ Mb
Resto igual

Sondas Cromosoma 22

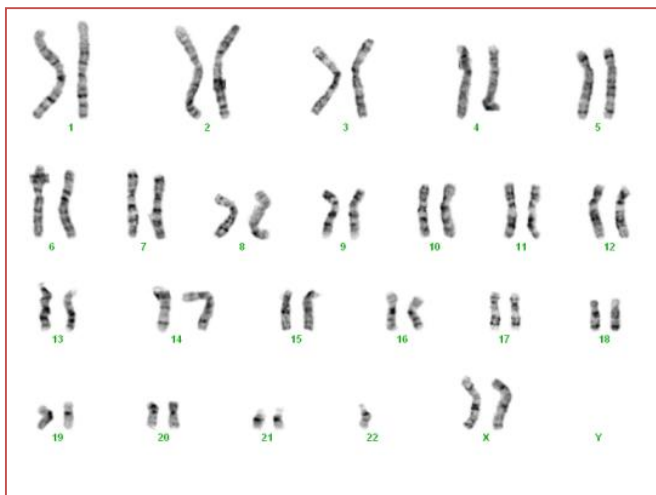


22q11.2 LSITUPLE1(Spectrum orange)

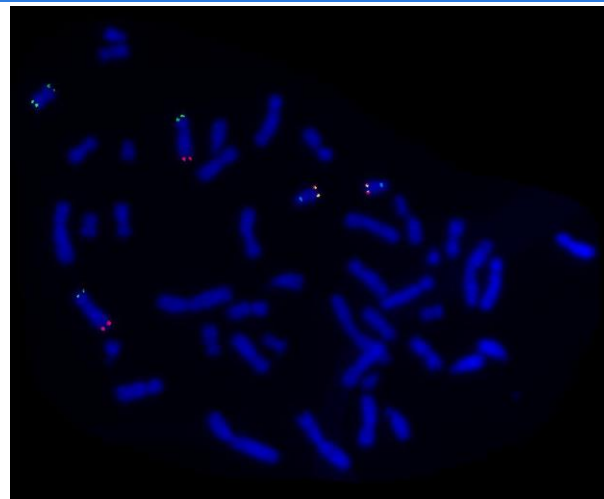
22q13LSI ARSA (Spectrum Green)



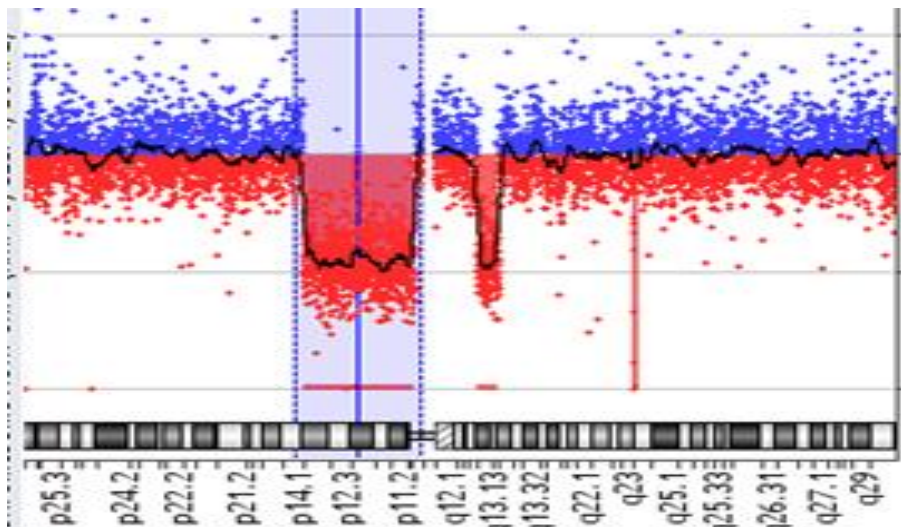
Sensibilidad para deleciones/ duplicaciones



Cariotipo Sensibilidad: 5 MB



FISH Sensibilidad: 40 a 250 Kb,
dirigido



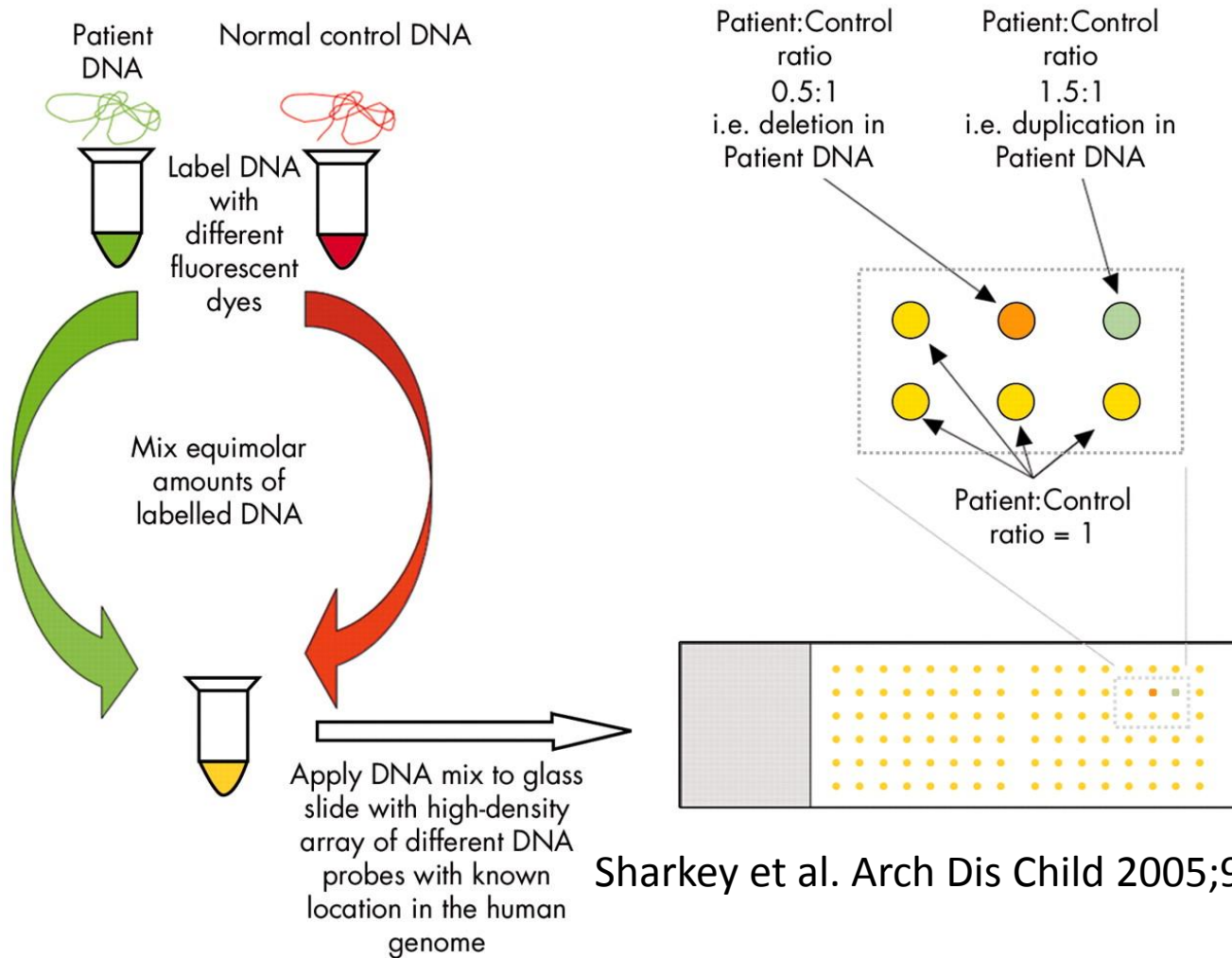
Hibridación genómica
comparativa Chromosomal
microarray Sensibilidad: ~ 30 Kb

Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)

- Detección de: DELECCIONES y DUPLICACIONES
- No es útil en rearrreglos balanceados (translocaciones e inversiones)

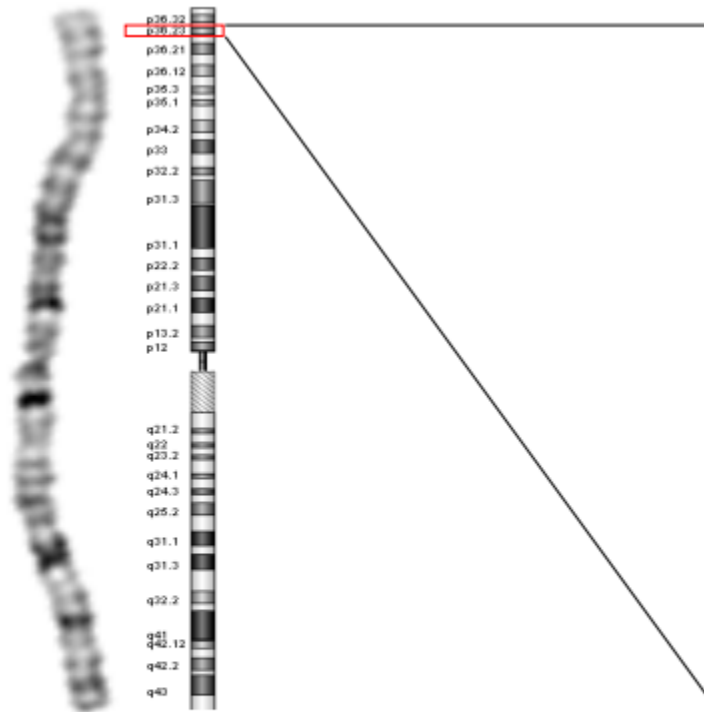
- En el genoma humano se identifican tres tipos de CNVs (variación en el número de copias)
 - Patogénico
 - Benignos
 - Significado desconocido (VOUS)

Hibridación genómica comparativa array (aCGH) (cariotipo molecular)



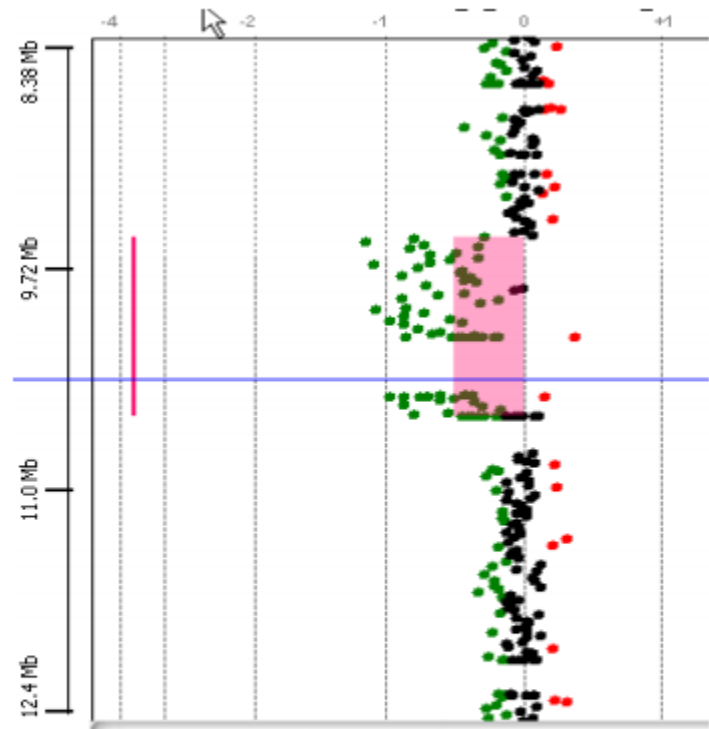
Sharkey et al. Arch Dis Child 2005;90:1264-1269

Comparación Cariotipo /CGH



Chromosome 1

Limits of detection for G-banded chromosome analysis is 4-5 Mb

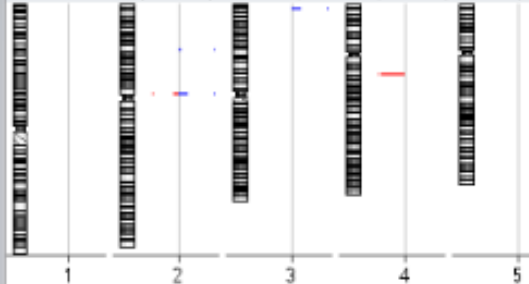


4 Mb region of microarray data showing a 1 Mb deletion encompassing ~70 oligos

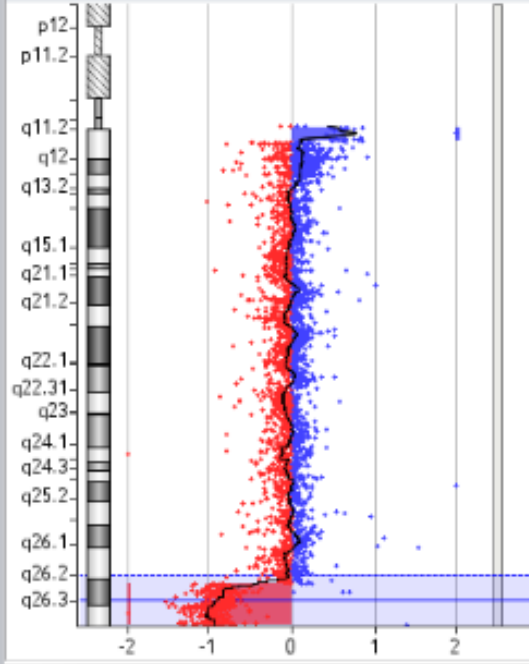
Características

- Análisis de número de copias de genoma completo
- Mayor densidad de sondas en regiones conocidamente asociadas a enfermedades genéticas:
 - Arrays: 180, 400 o mas sondas (oligos) cobertura genoma
 - Exones: 1700 a 4000 genes asociados a enfermedades
 - Regiones pericentroméricas (marcadores)
 - Regiones subteloméricas
 - Esqueleto. Cobertura: (30 Kb)
 - Confirmación: FISH o CGH a los padres

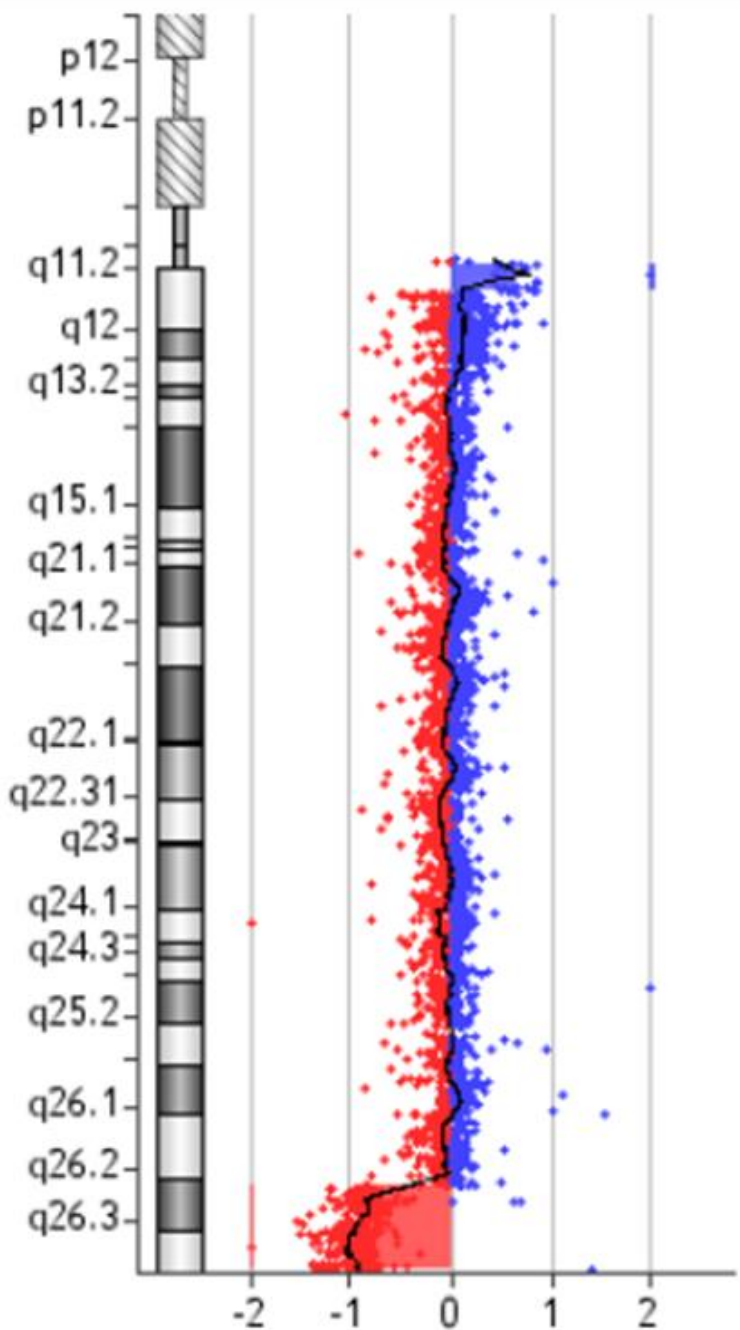
Genome View(AMP: 4, GAIN: 12, LOSS: 5, DEL: 1, LOH: 1)



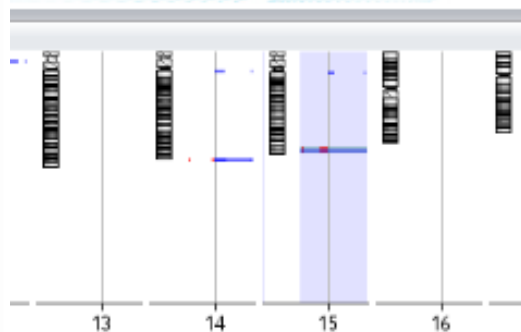
Chromosome View: chr15 (AMP: 0, GAIN: 1, LOSS: 1, DEL: 1)



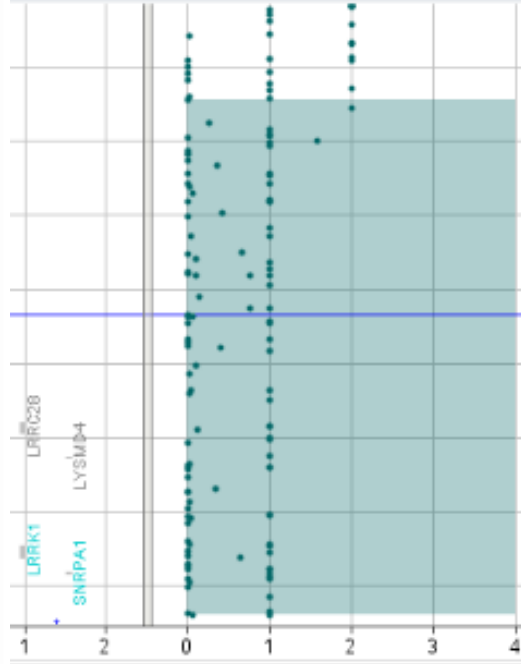
Chr 15



View | Copy | Search | Save



Mb



Utilidad clínica del CGH

Test de primera línea en:

- ✓ Retraso del desarrollo psicomotor/Discapacidad intelectual (RDS/DI)
- ✓ Malformaciones congénitas múltiples
- ✓ Desórdenes del Espectro Autista

aCGH

Ventajas

- Mayor sensibilidad (cariotipo), identifica alt. <10 Mb
- Alto número de enfermedades simultáneamente (FISH o MLPA)
- Identifica base genética de condiciones difíciles de diagnosticar clínicamente : Ej: Fenotipos leves o atípicos
- Deleciones y duplicaciones simultáneamente
- Mosaicos > 10-20%

Desventajas

- No identifica rearrreglos balanceados(translocaciones, inversiones)
- No identifica alteraciones mas pequeñas como : mutaciones puntuales deleciones /duplicaciones pequeñas
- No identifica mosaicos < 10%
- Detecta variantes polimórficas (CNV benignas)
- Alto costo
- Tiempo respuesta similar a cariotipo

Utilidad clínica

RDS/DI

Cariotipo: 3-4%

- FISH regiones subteloméricas: 2,5-3,5%
- aCGH (CMA): 15-20%

Prenatal

- = al cariotipo en alt. desbalanceadas
- CNV clínicamente relevantes no vistas en cariotipo: 6-8%
- Microdeleciones en conjunto son mas frecuentes que las trisomías clásicas

The NEW ENGLAND JOURNAL *of* MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

DECEMBER 6, 2012

VOL. 367 NO. 23

Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis

Ronald J. Wapner, M.D., Christa Lese Martin, Ph.D., Brynn Levy, M.Sc.(Med.), Ph.D., Blake C. Ballif, Ph.D.,

Análisis de microarrays cromosómico es igualmente eficaz que el cariotipo en la identificación de aneuploidías y reordenamientos desbalanceados, pero proporciona información adicional clínicamente significativa

Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis

Table 3. Frequency and Clinical Interpretation of Microdeletions and Duplications on Chromosomal Microarray in the 3822 Samples with a Normal Karyotype, According to Indication for Prenatal Testing.

Indication for Prenatal Diagnosis	Normal Karyotype	Common Benign	Pathogenic	Uncertain Clinical Significance (N = 130)		Total Known Pathogenic and Potential for Clinical Significance*
				Likely to Be Benign	Potential for Clinical Significance	
	<i>no.</i>		<i>no. (%)</i>			<i>no. (%) [95% CI]†</i>
Any	3822	1234 (32.3)	35 (0.9)	69 (1.8)‡	61 (1.6)	96 (2.5) [2.1–3.1]
Advanced maternal age	1966	628 (31.9)	9 (0.5)	37 (1.9)	25 (1.3)	34 (1.7) [1.2–2.4]
Positive on Down's syndrome screening	729	247 (33.9)	3 (0.4)	13 (1.8)	9 (1.2)	12 (1.6) [0.9–2.9]
Anomaly on ultrasonography	755	247 (32.7)	21 (2.8)	16 (2.1)	24 (3.2)	45 (6.0) [4.5–7.9]
Other§	372	112 (30.1)	2 (0.5)	3 (0.8)	3 (0.8)	5 (1.3) [0.6–3.1]

* Total includes those predetermined as known to be pathogenic and those classified by the clinical advisory committee as clinically relevant.

† CI denotes confidence interval.

‡ Includes 36 samples determined likely to be benign by the study geneticist and 33 determined by the independent clinical advisory committee on the basis of size, gene content, inheritance, the literature, and ultrasonography findings.

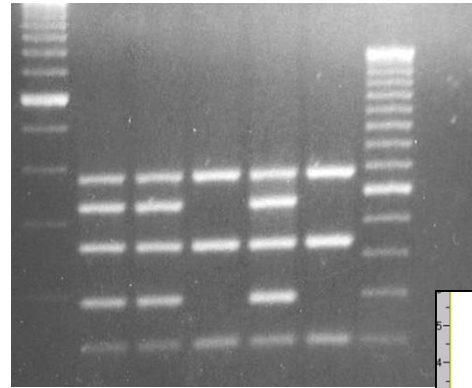
§ Other indications include family history, previous pregnancy with chromosomal abnormalities, and elective decision.



The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

Mutaciones génicas

- Tradicional:

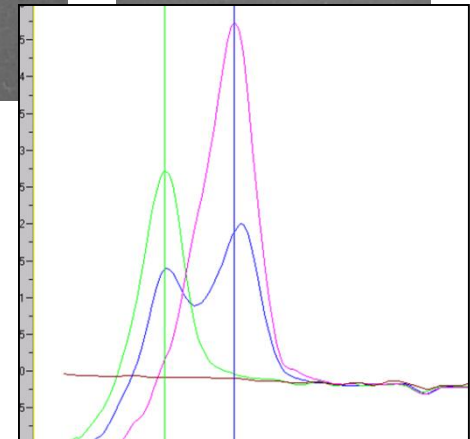


- Más recientes:

- Actuales: PCR fluorescente

MLPA

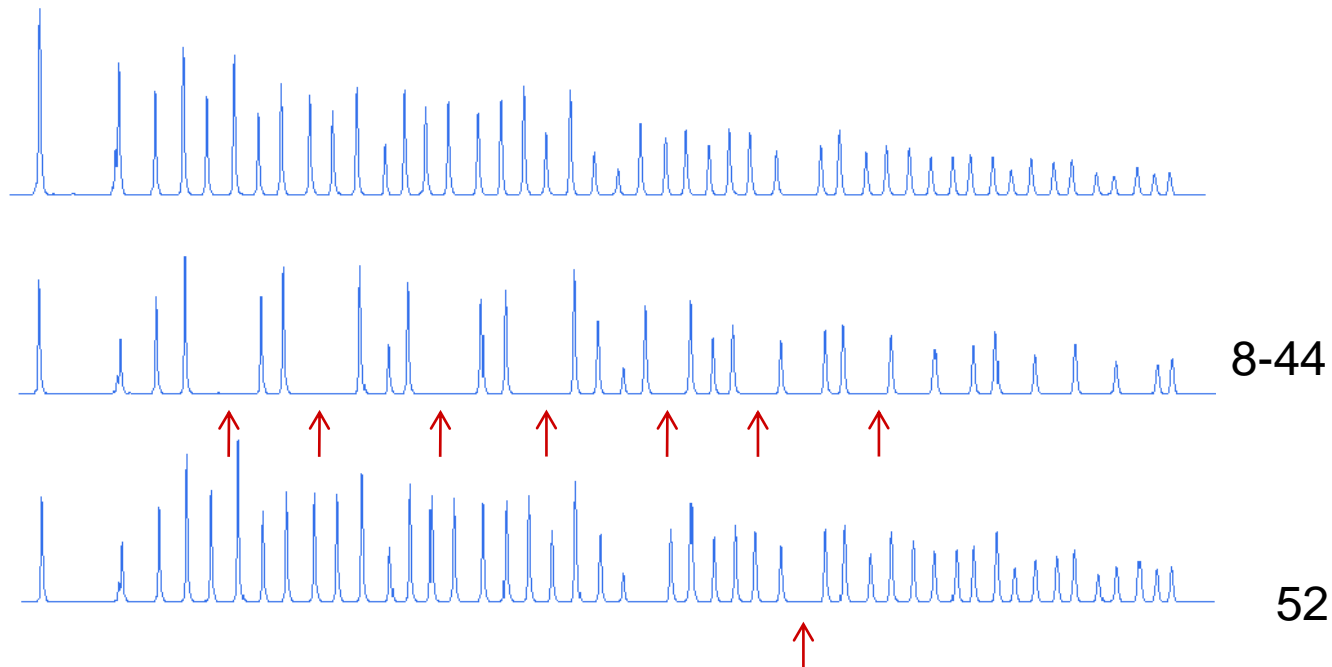
Secuenciación de ácidos nucleicos



Distrofia Muscular de Duchenne MLPA

Ligado al X (Xp21) Distrofina 79 exones

Predicción de severidad del cuadro

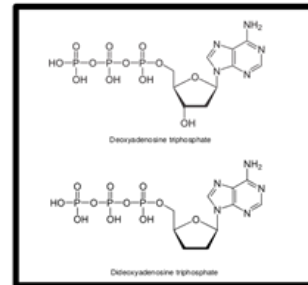
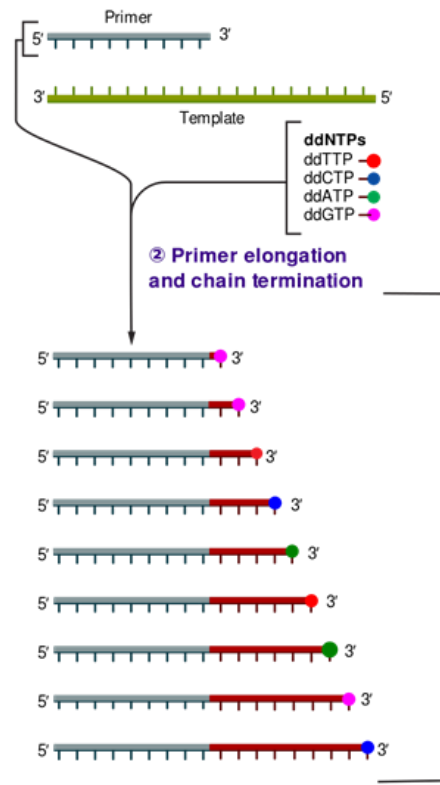


Secuenciación de ácidos nucleicos

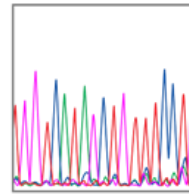
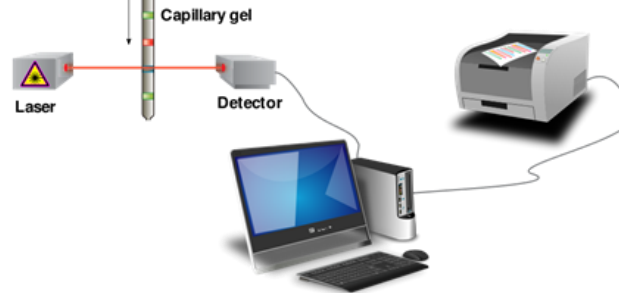
Sanger

① Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)

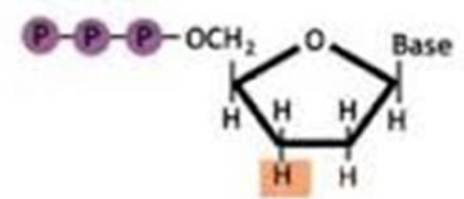


③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

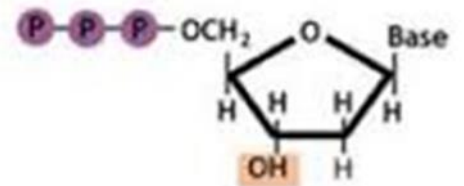


Chromatograph

④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



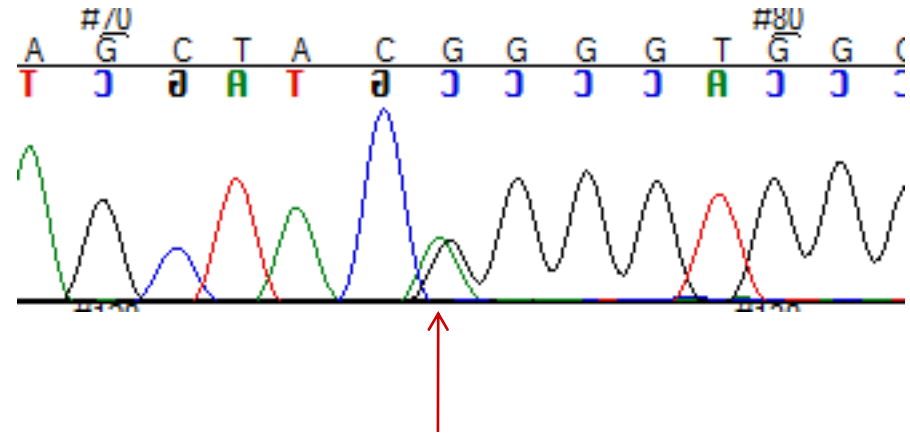
dideoxynucleotide (ddNTP)



deoxynucleotide (dNTP)

Acondroplasia/Hipocondroplasia

- Crecimiento óseo anormal/talla baja
- Autosómica Dominante
- Mutación *de novo* en gen FGFR3 (19 exones) 95% → mutación puntual

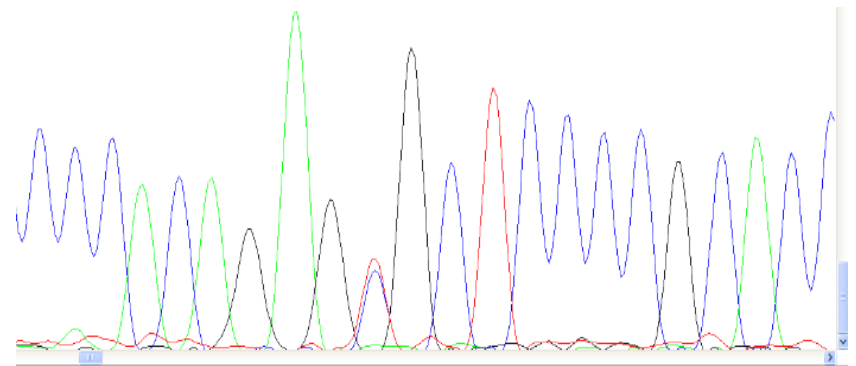


c.1138G>A
p.Gly380Arg

Displasia Tanatofórica

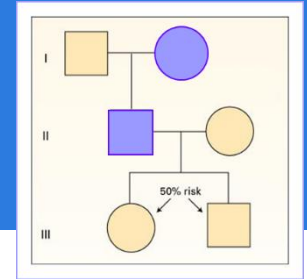
Displasia Tanatofórica tipo I
p.Arg248Cys (55%)
p.Tyr373Cys (24%)
p.Ser249Cys (6%) } 85%

Displasia Tanatofórica tipo II
p.Lys650Glu (100%)



c.742C>T
p.Arg248Cys

Síndrome de Noonan



No disponibles datos epidemiológicos precisos

Prevalencia: 1:1,000 -2,500 RNV (gravemente afectados)

Autosómico dominante

Desorden Clínicamente heterogéneo caracterizado por:

- .Talla baja
- .Dismorfias faciales
- .Amplio espectro de defectos cardíacos congénitos

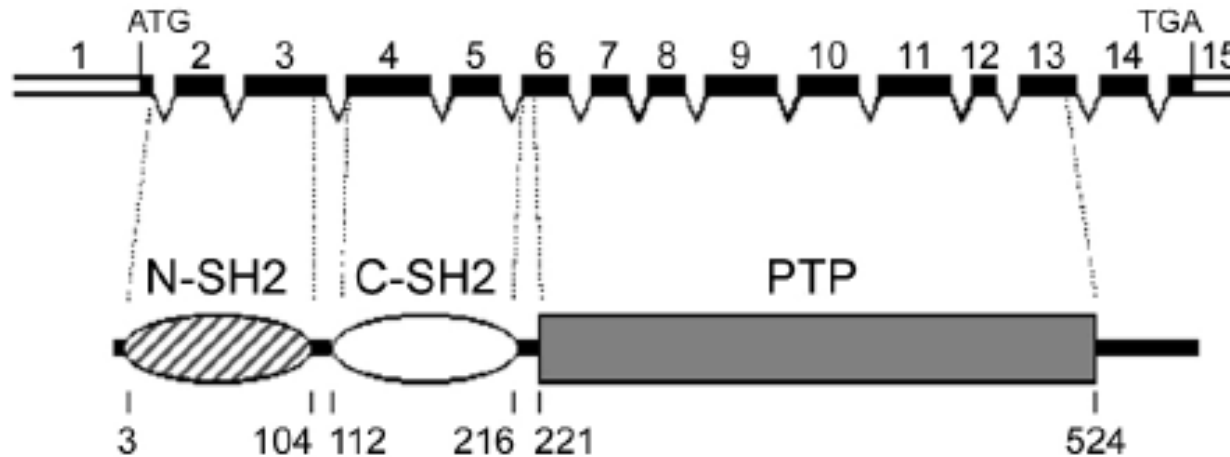
Cariotipo normal



PTPN11

Gen *PTPN11*: Non-receptor-type protein tyrosine phosphatase: SHP-2

Fue identificado como el primer gen asociado a NS 1782 bp → 594 aa

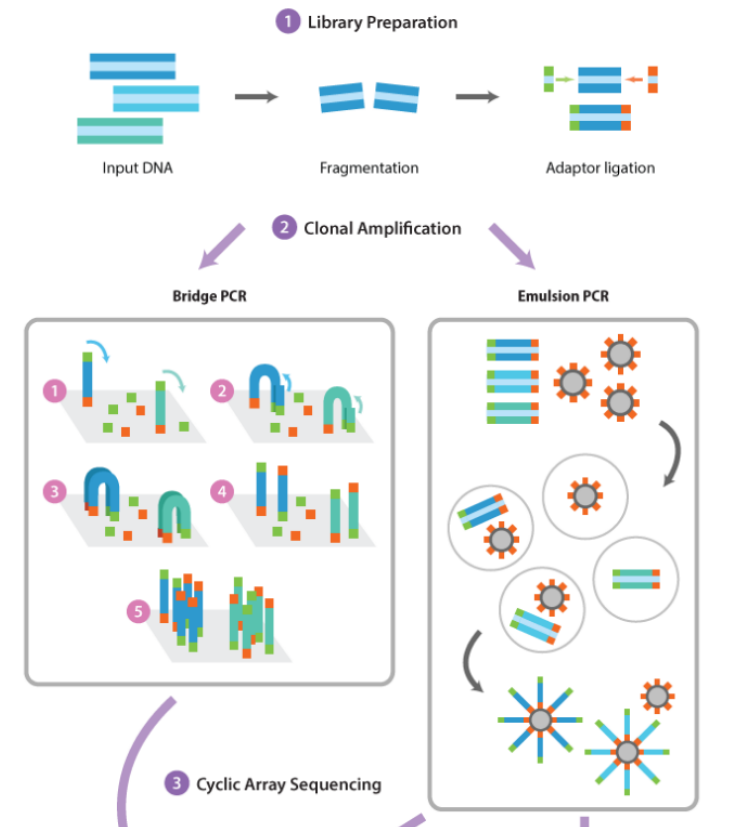




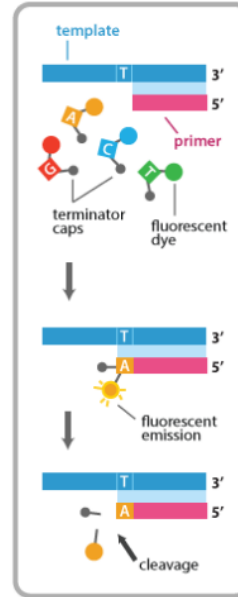
Exon 3
 317A→C
 D106A
 Asp106Ala

Next Generation Sequencing (NGS)

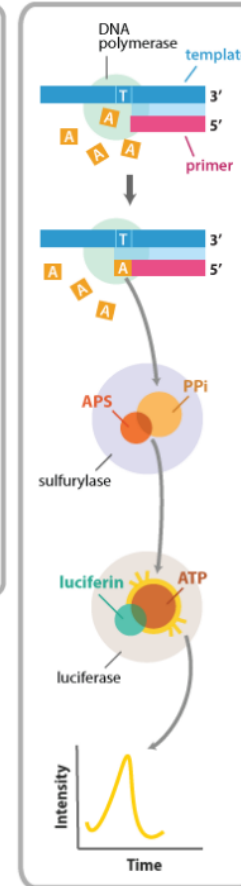
Next Generation Sequencing



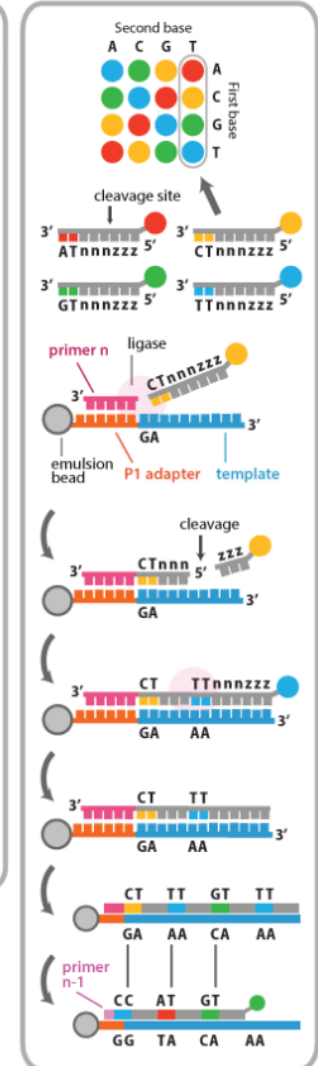
Sequencing by Synthesis



Pyrosequencing



Sequencing by Ligation



Secuenciación de nueva/siguiente generación

- Masiva
- Distintas plataformas
- Dificultades



©2010, Illumina Inc. All rights reserved.

Next Generation Sequencing (NGS)

NGS en DxPrenatal:

- Nuevas Técnicas No Invasivas de Diagnóstico Prenatal (NIPT)
- ADN fetal libre en sangre materna
- Identificación de trisomías 13, 18, 21 y aneuploidías de los cromosomas sexuales
- Deleciones y duplicaciones (solo algunas plataformas y validez cuestionable)

Gracias

