

# CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente

Facultad de Medicina, Universidad de Chile



# Técnicas de Estudio Genético en Diagnóstico Prenatal

Dra. Andrea Romero Ibaceta

Dr. Daniel Martin

Dr. Juan Guillermo Rodríguez

Dra. Daniela Cisternas

# Generalidades



- Origen genético de enfermedades neonatales en 4%.
- Aberraciones cromosómicas.
- Enfermedades monogénicas causadas por única mutación de un gen.
- Enfermedades poligenéticas/multifactoriales.

# Motivos más frecuentes de análisis de cariotipo



- Edad materna.
- Resultado anormal de técnica no invasiva.
- Resultado anormal de ultrasonido.
- En presencia de traslocación, inversión o inserción en un padre.
- Anomalía cromosómica en hijo previo.

# Obtención de muestra



- Amniocentesis.
- Biopsia de vellosidades coriales.
- Biopsia placenta.
- Cordocentesis.

# Amniocentesis



- Guía US.
- > 15-17 sem.
- Riesgo de aborto 0,5% a 1%.
- 15 ml de LA.
- Cultivo celular (2 semanas).
- Detectar aneuploidías cromosómicas y anomalías estructurales mayores a 5-10 megabases.
- Análisis FISH (1 a 3 días).



# Biopsia vellosidades coriales



- 11-12 sem EG
- Cultivo celular (1 día o 7 – 10 días)

# Cordocentesis



- >16-20 sem EG
- Punción de vena umbilical
- Obtención de linfocitos desde la sangre del cordón fetal
- 3 a 5 días



**TABLE 1****Invasive prenatal diagnostic methods**

Technique	Timing	Miscarriage risk	Applications
Chorionic villus sampling	11–14 weeks	~ 1 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>– chromosome analysis (karyotyping)</li> <li>– molecular genetic diagnosis</li> <li>– biochemical diagnosis</li> </ul>
Amniocentesis	15–17 weeks	0.5 %–1 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>– chromosome analysis</li> <li>– diagnosis of open neural tube defects</li> <li>– molecular genetic diagnosis</li> <li>– biochemical diagnosis</li> </ul>
Placental biopsy	From 15 weeks	~ 1%	<ul style="list-style-type: none"> <li>– chromosome analysis</li> <li>– molecular genetic diagnosis</li> <li>– biochemical diagnosis</li> </ul>
Cordocentesis	from 16–20 weeks <sup>*1</sup>	~ 1 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>– chromosome analysis</li> <li>– hematological and biochemical diagnosis</li> </ul>
Fetal biopsy	from 20 weeks	<sup>*2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– diagnosis of specific genetic dermatoses</li> </ul>



\*1 ...

# Tipos de pruebas genéticas disponibles

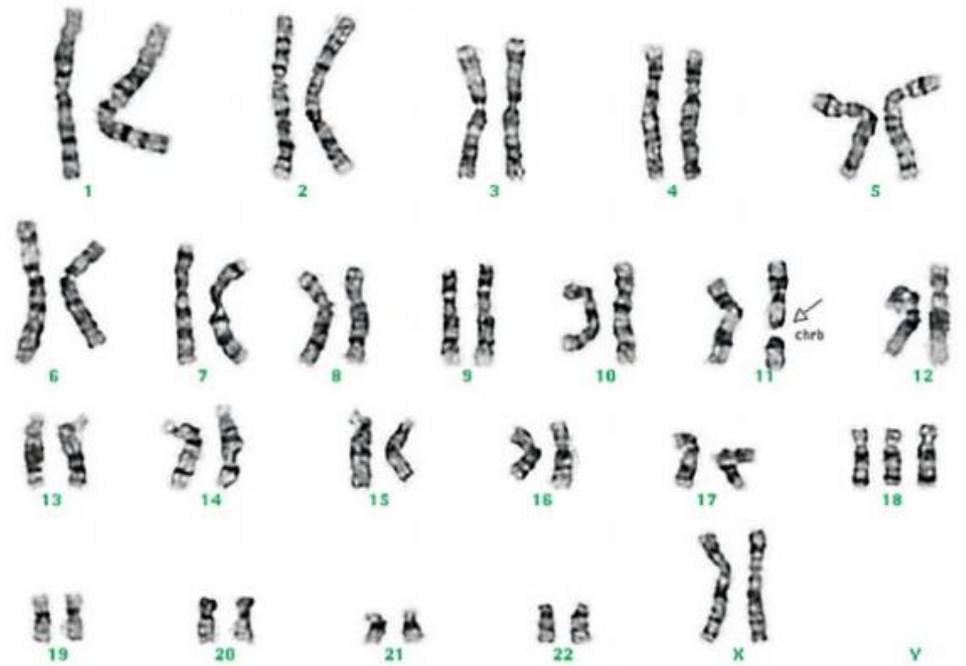


- Citogenéticas
- Bioquímicas
- Moleculares

# Pruebas citogenéticas



- Identificar anomalías estructurales
- Cultivo – Fijación – Tinción
- Patrones de bandas

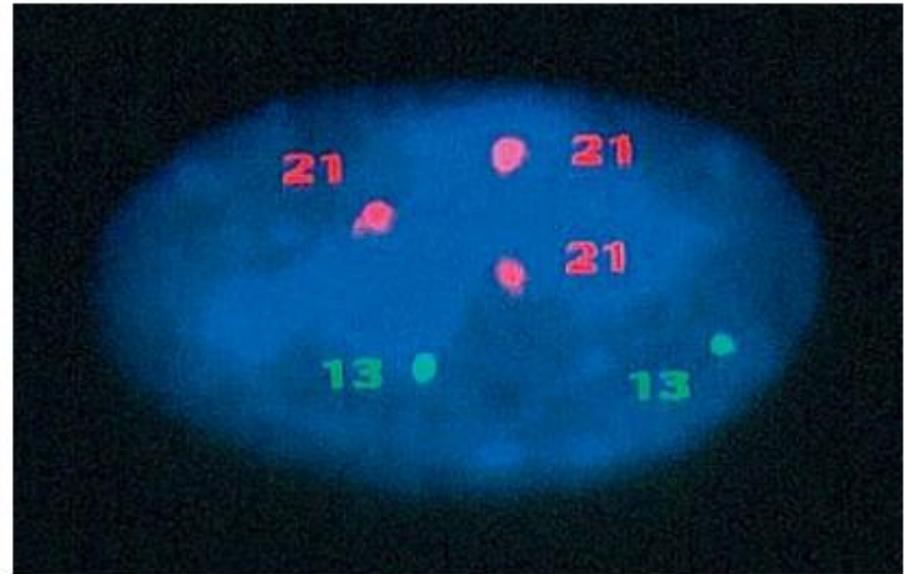


**Figure 2:** Karyotype of a fetus with trisomy 18. Three copies of chromosome 18 can be seen. One copy of chromosome 11 shows a break (see arrow) consistent with a preparation artefact

# Pruebas citogenéticas



- La hibridación fluorescente in situ (FISH).
- Tiñe con colores vivos los cromosomas o partes de los cromosomas con moléculas fluorescentes para identificar anomalías cromosómicas.
- Estudio de los cinco cromosomas involucrados en las aneuploidías más frecuentes (cromosomas 13, 18, 21, X e Y).



**Figure 3:** Demonstration of Down syndrome (trisomy 21) in a prenatal rapid diagnostic test using FISH analysis with probes specific for chromosomes 13 (green) and 21 (red). The three red signals confirm trisomy 21

# Pruebas bioquímicas



- Análisis de proteínas
- Medición directa o indirecta de la actividad enzimática (actividad de proteínas o nivel de metabolitos).
- Estructura de las proteínas (tamaño o cantidad)
- Almacenaje y transporte adecuado

# Pruebas bioquímicas



- Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
- Cromatografía líquida / espectrometría de masa (GC/MS)
- Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)
- Fluorimetría
- Radioisotopía
- Cromatografía en capa fina

# Pruebas moleculares



- Cuando se conoce la secuencia del gen.
- Diferentes técnicas: secuenciación directa, ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación.
- Repetición de los ciclos de desnaturalización (separación del ADN de doble cadena inducida por calor), el apareamiento (unión de cebadores específicos del segmento deseado a una cadena parental de DNA) y la elongación (extensión de las secuencias cebadoras para formar una nueva copia de la secuencia deseada).

# Pruebas moleculares



- La hibridación genómica comparativa (CGH) o análisis de micromatrices cromosómicas (CMA)
- Analizar ganancias o pérdidas del DNA
- Proporción entre DNA del paciente etiquetado con moléculas fluorescentes y el DNA normal de referencia.
- Detecta eliminaciones y duplicaciones incluso de exones.
- No detecta inversiones, traslocaciones recíprocas equilibradas o alteraciones en el número de copias de cromosomas.
- No requiere cultivo.

# Pruebas moleculares



- Análisis de micromatrices del DNA (Análisis de genes/genoma/AND)
- Determinar la expresión genética.
- Las moléculas de ARNm unen, o hibridan, específicamente a una plantilla de ADN, por lo general, un gen entero o parte del cual se originó.
- Detectar la cantidad de ARNm unida a cada sitio en la micromatriz.

# Pruebas moleculares



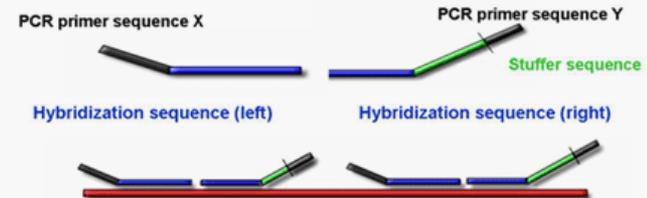
- Análisis de micromatrices de proteínas.
- Determinar la cantidad de proteínas presentes en una muestra biológica.
- Hibridación de proteínas marcadas en una muestra del paciente se mide en comparación con la muestra de referencia.
- Presencia, ausencia, aumento o reducción de una proteína



# Pruebas moleculares

- MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).
- En una misma reacción se pueda detectar copias anormales de hasta 50 secuencias genómicas diferentes de ARN o ADN.
- Primera reacción de unión-ligación de sondas con la zona homóloga de interés; sólo las sondas que hayan hibridado podrán ser ligadas, y posteriormente amplificadas por PCR.
- Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas, se podrán identificar aberraciones en el número de copias genómicas.

## 1. Denaturation and Hybridization



## 2. Ligation



## 3. PCR with universal primers X and Y exponential amplification of ligated probes only



## 4. Fragment analysis



# Otras técnicas: Cell-free DNA



- Fragmentos pequeños de DNA celular en circulación materna.
- 5-20% DNA fetal.
- Aumenta con edad gestacional.
- Influenciado por peso materno, tabaquismo y pre-eclampsia.

