

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Exámenes genéticos II: FISH, Cariograma, MLPA. Técnica y rendimiento prenatal.

Autora: Dra. Clara Rioseco R.

Tutores: Dr. Sergio De La Fuente G. Dra. Catherine Díaz.

Obstetricia y Ginecología - Medicina Materno Fetal

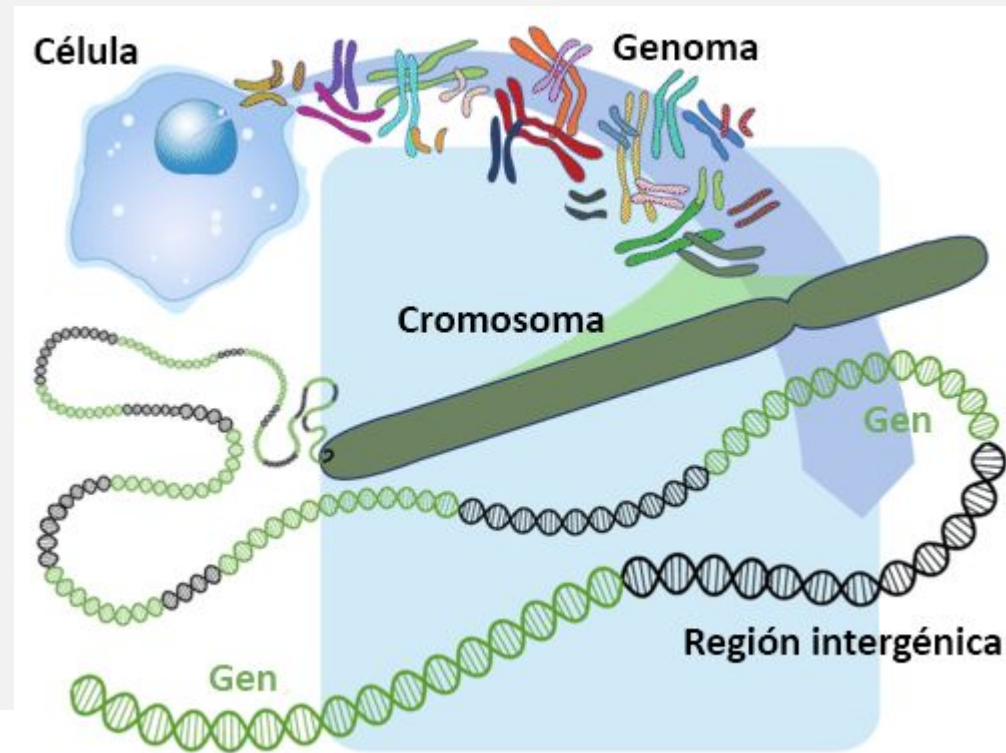
Genoma: información genética que caracteriza a un individuo, heredada de los progenitores

23 Pares de cromosomas

Contienen información genética almacenadas en unidades de información: **genes**

Genoma: 3.000 Mb, 23.000 genes.

Exoma: parte del genoma que codifica para proteínas (2% del genoma)





Anomalías genéticas

01

Anomalías cromosómicas

- Numéricas
- Estructurales

02

Síndromes microdelección y microduplicación

- fragmentos entre 10 KB y 10 MB.

03

Enfermedades monogénicas

- autosómicas dominantes
- autosómicas recesivas
- ligadas al cromosoma X

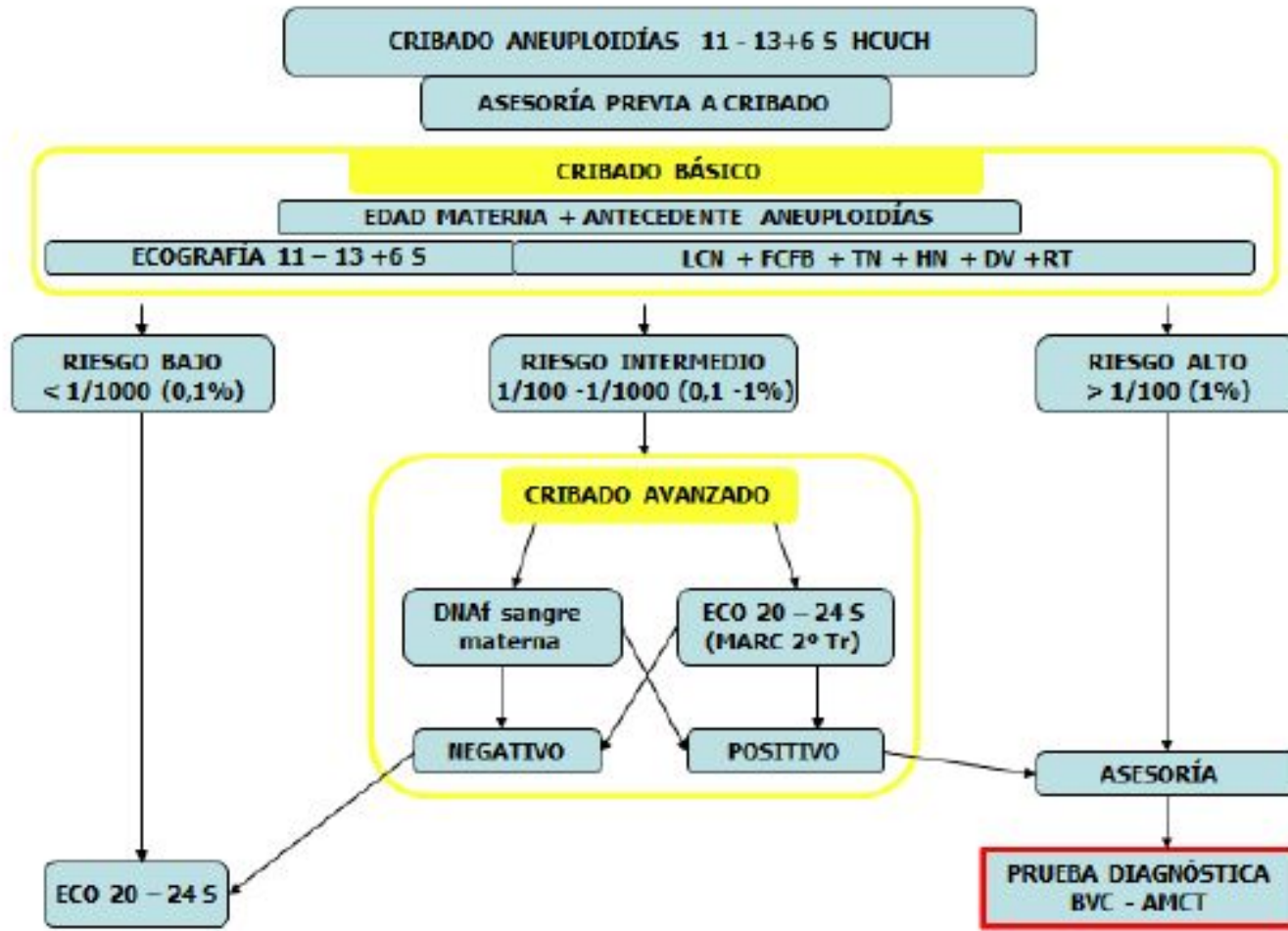


Test genéticos: Diagnóstico prenatal





Indicaciones test genéticos



Indicaciones test genéticos



Padres portadores de reordenamiento cromosómico balanceado

Consanguinidad

Aborto espontáneo aneuploide en gestación previa

Historia familiar de malformaciones congénitas/alteraciones genéticas

Retraso de crecimiento intrauterino severo

Exposición a teratógenos

Hijo previo con anomalía genética

Hallazgos ultrasonográficos de malformaciones fetales

Riesgo alto para anomalías cromosómicas calculado por tamizaje ecográfico o en Test Prenatal No Invasivo (DNA libre en sangre materna)



Importancia test genéticos

Las malformaciones congénitas

Importante

asociación a
alteraciones genéticas

- 25% por aneuploidía
- 10% por variación del número de copias
- 20% mutaciones monogénicas
- 40% multifactoriales

2^o causa mortalidad infantil

Las malformaciones congénitas son la 2da causa de mortalidad infantil (32%).

- Causan el 54% de las hospitalizaciones pediátricas.

60%

abortos espontáneos del primer trimestre

1/150 RNV las presenta

- 5% mortinatos
- 5-7% de las muertes en lactantes e infantes



Tipos de test genéticos

No invasivos

- Cálculo de riesgo eco 11-14 sem
- DNA fetal libre en sangre materna

Invasivos

Procedimientos invasivos:

- Biopsia vellosidades coriales
- Amniocentesis
- Cordocentesis

Estudios genéticos antenatales:

- Citogenética
- Genética molecular



Procedimientos invasivos



Biopsia vellosidades coriales

Semana 10-13 de edad gestacional

Vía abdominal o transcervical

Riesgos: pérdida del embarazo 0,22%, 32% metrorragia. Riesgo falla cultivo, infección o rotura de membranas < 0,5%.

Amniocentesis

A partir de las 16 semanas

Riesgo pérdida del embarazo 0,13-0,27%, punción transplacentaria no otorga mayor riesgo de pérdida del embarazo

Riesgo rotura de membranas o sangrado 1-2%.

Cordocentesis

Desde semana 20 de edad gestacional.

Riesgo 1,3% pérdida del embarazo

Riesgo 5-10 % de bradicardia y 20-30% sangrado desde el sitio de punción



Cariograma

Analiza número y estructura de los cromosomas en metafase:
evalúa la **dotación cromosómica completa**

Estudio del patrón de bandas mediante **bandeo G**.

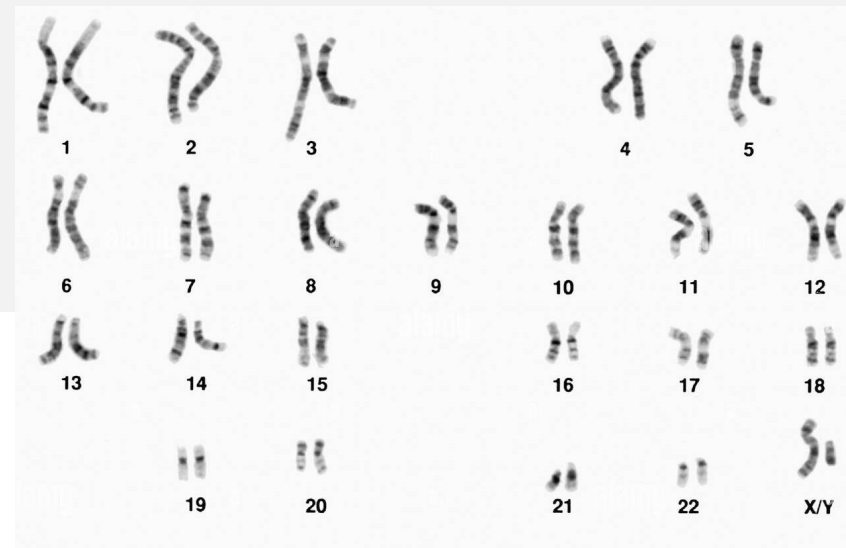
Requiere procesamiento manual e interpretación por experto

Analiza 25-50 células en metafase.

Número de bandas mínimo para un cariotipo prenatal 250-400.

Detección de mosaicismos entre 6 a 12% según número de metafases alizado.

Costo-efectivo.





Cultivo corto

Células del trofoblasto → 3 a 7 días
Sin riesgo de contaminación materna
2% riesgo de detectar anomalías confinadas a la placenta
1/3000 falsos negativos → cultivo largo

Cultivo largo

Células mesenquimáticas (BVC, AMCT) → 10-15 días.
Riesgo de contaminación materna.
Menos falsos negativos, menos probabilidad de detectar anomalía confinada a la placenta.

Cultivo en sangre fetal

Utiliza **linfocitos de sangre fetal.**
(7 días)



Identifica las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales **> 5-10 MB con una precisión diagnóstica de un 99,5%.**

Se observan anomalías del cariotipo en alrededor del **50%** de los fetos con malformaciones estructurales a la ecografía.

Alteraciones del número: monosomías, trisomías, nulisomías (pérdida de un par), tetrasomías, poliploidías

Alteraciones en la estructura del cromosoma: duplicaciones, deleciones, translocaciones **balanceadas** o robertsonianas, translocaciones desbalanceadas, inversiones, cromosomas en anillo, cromosomas marcadores.

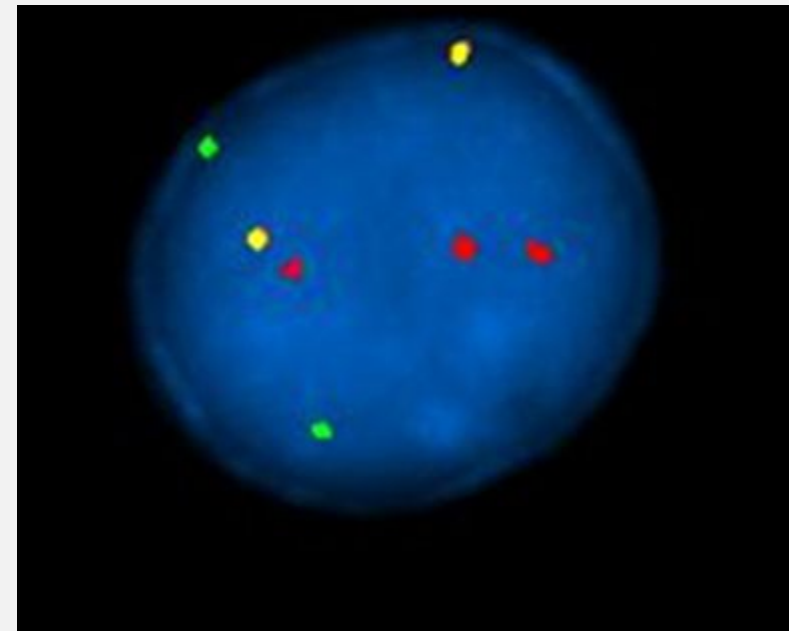
FISH (Fluorescence in situ hybridization)



Sonda fluorescente detecta la presencia o ausencia de cromosomas o segmentos específicos de cromosomas (microdeleciones o duplicaciones).

Resultados en 48-72 horas

FISH en metafase (resolución 2 Mb) o interfase (resolución 40-250 Kb)



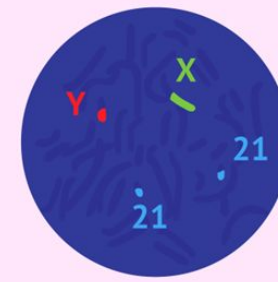
FISH en interfase

Utilizada en:

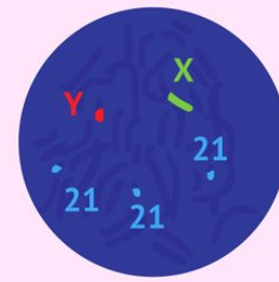
- caracterización cromosómica: diagnóstico rápido de aneuploidías 13, 18, 21, X e Y.
- microdelecciones, duplicaciones específicos.
- detecta presencia de mosaicismo sobre el 5%.

Limitaciones:

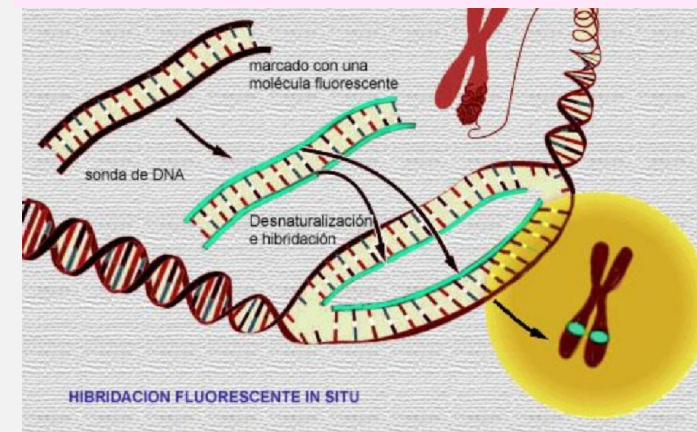
- Falsos negativos o falsos positivos descritos entre 0,024% y 0,044% respectivamente → atribuido a factores técnicos, o hibridación cruzada que disminuye o anula señal.
- No identifica mutaciones pequeñas, disomía uniparental, inversiones cromosómicas.



Healthy embryo



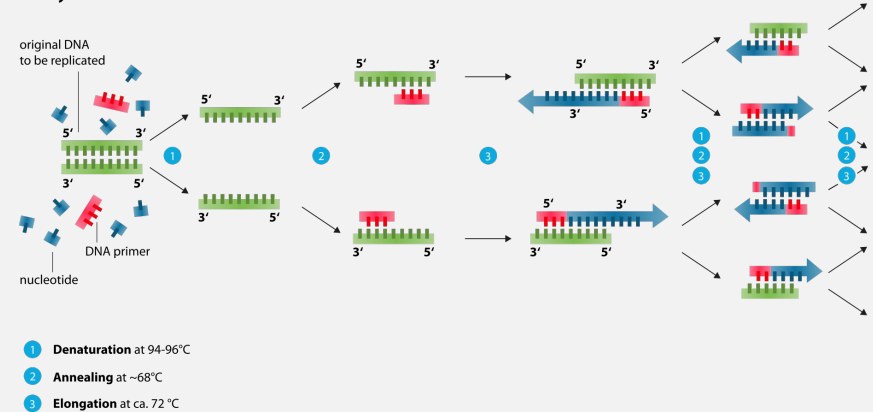
Embryo with Down syndrome



QF-PCR (quantitative fluorescence PCR)

- Amplificación exponencial de segmentos específicos de ADN (STR/marcadores microsátélites) de los cromosomas estudiados.

Polymerase chain reaction - PCR

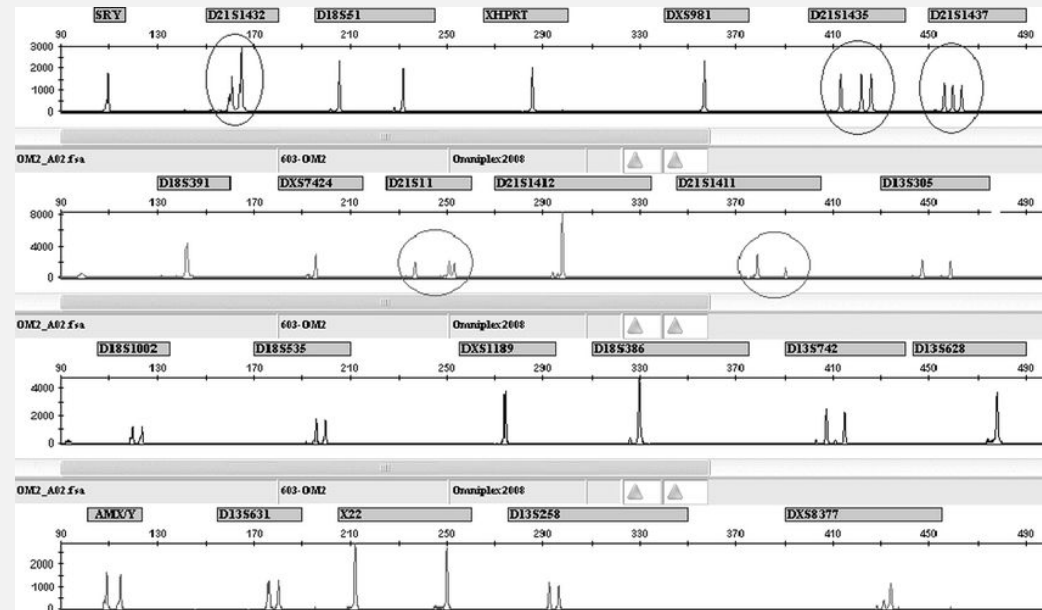


- STR: Short Tandem Repeats, son marcadores de cada cromosoma y se marcan con fluorocromos → amplificación y cuantificación. Identificando aneuploidías 13, 18, 21, X e Y.



- **En Chile:** resultado en 48 hrs.
 - **Especificidad** reportada hasta del **100%** (Laboratorio Red Salud UC).

- En estudios: **VPP 100%**, **VPN 99,7%**. Riesgo residual del **0,05%** de un fenotipo desfavorable tras una QF PCR normal en casos de bajo riesgo de aneuploidía.



SINFEX RED UC CHRISTUS. ANEUPLOIDÍA, PCR FLUORESCENTE DE LOS CROMOSOMAS 13,18, 21, X e Y.

<https://appsinfex.ucchristus.cl/Sinfex/docs/view/a9c6080023e64c93a24031b9840ba0b8>

Langlois, S., Duncan, A., Wilson, R. D., Audibert, F., Brock, J.-A., Carroll, J., Cartier, L., Désilets, V. A., Gagnon, A., Johnson, J.-A., Langlois, S., Murphy-Kaulbeck, L., Okun, N., Pastuck, M., Langlois, S., Chitayat, D., DeBie, I., Demczuk, S., Désilets, V. A., ... Skidmore, D. (2011). Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada [Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada]*, 33(9), 955–960. [https://doi.org/10.1016/s1701-2163\(16\)35022-8](https://doi.org/10.1016/s1701-2163(16)35022-8).

Hospital Clínic | Hospital Sant Joan de Déu | Universitat de Barcelona, Antoni Borrell i Joan Sabrià, Celia Bádenas, Laia Rodríguez-Revenga, Anna Soler, Meritxell Jodar, Josep Oriola. (2021).

ESTUDIOS GENÉTICOS EN MUESTRAS FETALES. <https://fetalmedicinebarcelona.org/wp-content/uploads/2024/02/EstudiosGeneticosEnMuestrasFetales.pdf>



Ventajas

- Rapidez (24-48 hrs)
- Pequeño volumen de muestra
- No requiere cultivo
- Proceso **automatizado**
- Detecta contaminación materna en muestra fetal

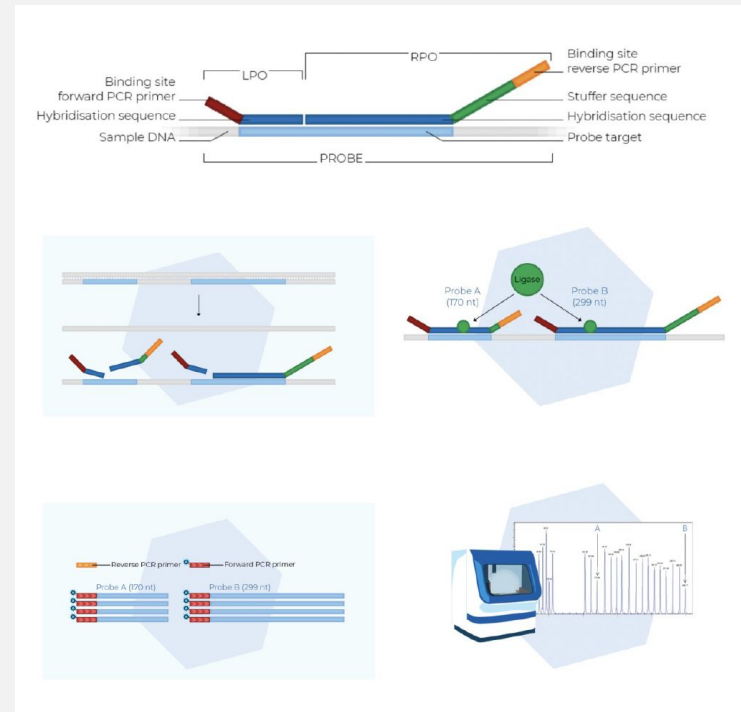
Limitaciones

- Restringido a 5 cromosomas
- No detecta monosomías
- No detecta deleciones
- Detecta mosaicismos sobre 30%
- No distingue trisomía libre/translocación

MLPA (multiple ligand probe amplification)

Sondas que detectan secuencias específicas de ADN, se unen a secuencia diana de forma adyacente ligándose entre ellas → amplificación por PCR.

Señal emitida por sondas amplificadas permite analizar el número de copias de la región de interés.








VIDEO: <https://youtu.be/gfLJxKuqleY>



Permite diagnóstico de:

- Microdeleciones/Duplicaciones de regiones o genes específicos.
- Variantes de número de copias (CNV), pequeños reordenamientos.
- Alteraciones de la impronta/metilación (MS - MLPA).
- Disomía uniparental

	Sample Type	Container	Transportation Temperature	Volume
	Peripheral blood	EDTA vacutainer	20-25°C	3 – 4 ml
	Purified genomic DNA	In a sealed Eppendorf tube	20-25°C	A minimum 1 microgram of DNA at a concentration of 50-100ng/μl
	POC (fetal tissue)	Tissue in sterile container in saline and cardiac or cord blood in vacutainer	20-25°C	3 – 4 mm POC specimen or 50 100 mg of each tissue
	Amniotic Fluid	Sterile container	20-25°C	10-15ml
	Chorionic villi	Sterile container with culture medium or saline solution with 1% antibiotic	2-8 °C	300-500mg



Limitaciones: no puede detectar

- reordenamientos cromosómicos equilibrados
- deleciones y duplicaciones que quedan fuera del alcance de las sondas de MLPA utilizadas (teloméricas, mutaciones puntuales, inserciones y deleciones pequeñas).
- repeticiones secuenciales o mutaciones en el ADN mitocondrial.

Sensibilidad analítica y especificidad para MLPA: **99%**

Norton, M. E., Kuller, J. A., & Dugoff, L. (Eds.). (2019). *Genética Perinatal*. Elsevier.

Langlois, S., Duncan, A., Wilson, R. D., Audibert, F., Brock, J.-A., Carroll, J., Cartier, L., Désilets, V. A., Gagnon, A., Johnson, J.-A., Langlois, S., Murphy-Kaulbeck, L., Okun, N., Pastuck, M., Langlois, S., Chitayat, D., DeBie, I., Demczuk, S., Désilets, V. A., ... Skidmore, D. (2011). Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada [Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada]*, 33(9), 955–960. [https://doi.org/10.1016/s1701-2163\(16\)35022-8](https://doi.org/10.1016/s1701-2163(16)35022-8)

MRC Holland (2022). Protocolo general de MLPA.

MLPA – Multiplex ligation-dependent probe amplification - IGENOMIX Latino América. (2021, abril 27). Igenomix.com. <https://latam.igenomix.com/diagnostico-genetico/analisis-genes-individuales/mlpa/>

Conclusiones



- El estudio de enfermedades genéticas resulta cada vez más crucial en el adecuado manejo de patologías materno fetales.
- Se debe avanzar hacia la modernización de los estudios genéticos con disponibilidad amplia hacia la población, con protocolos de derivación a estudio genético razonables para hacer un uso efectivo del recurso.
- El equipo médico debe conocer las herramientas de cada test para indicar de forma adecuada la realización de ellos.

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Exámenes genéticos II: FISH, Cariograma, MLPA. Técnica y rendimiento prenatal.

Autora: Dra. Clara Rioseco R.

Tutores: Dr. Sergio De La Fuente G. Dra. Catherine Díaz.

Obstetricia y Ginecología - Medicina Materno Fetal