



Seminario N°8: QF-PCR, Array y CGH. Técnica y aporte de su uso prenatal

Dra. Gabriela Rodríguez B.
Tutora: Dra. Catherine Díaz

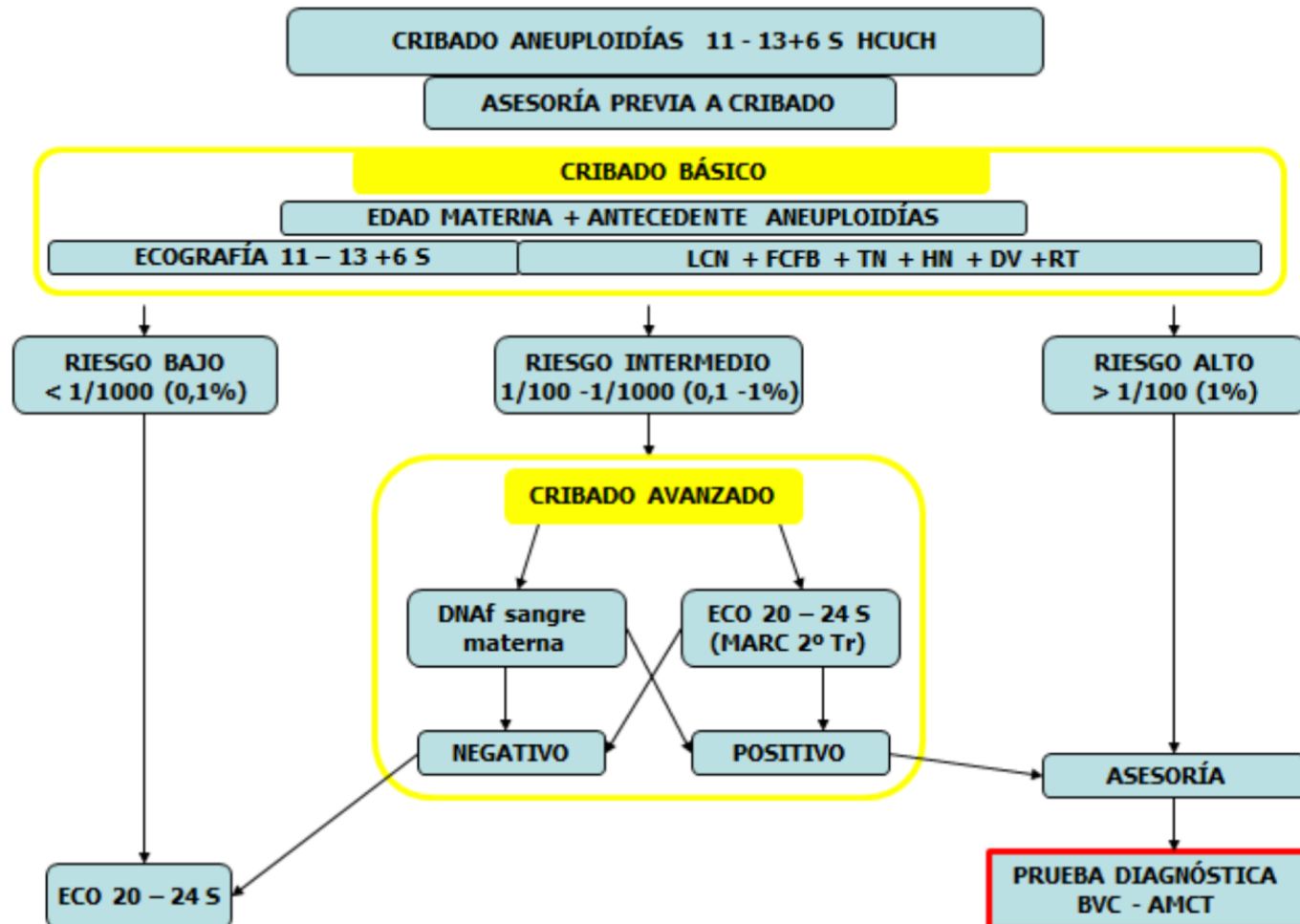
INTRODUCCION

Los trastornos genéticos fetales son anomalías en la estructura o función causadas por diferencias en el genoma.

Los tests genéticos prenatales son pruebas dirigidas al análisis del genoma fetal con el fin de identificar la causa genética de una determinada enfermedad.

Diagnóstico prenatal: Conjunto de pruebas diagnósticas que se realizan durante el embarazo para intentar identificar la presencia de posibles anomalías congénitas en el feto o factores de riesgo maternos que pueden requerir controles estrictos a lo largo de la gestación

CRIBADO DE ANEUPLOIDÍAS

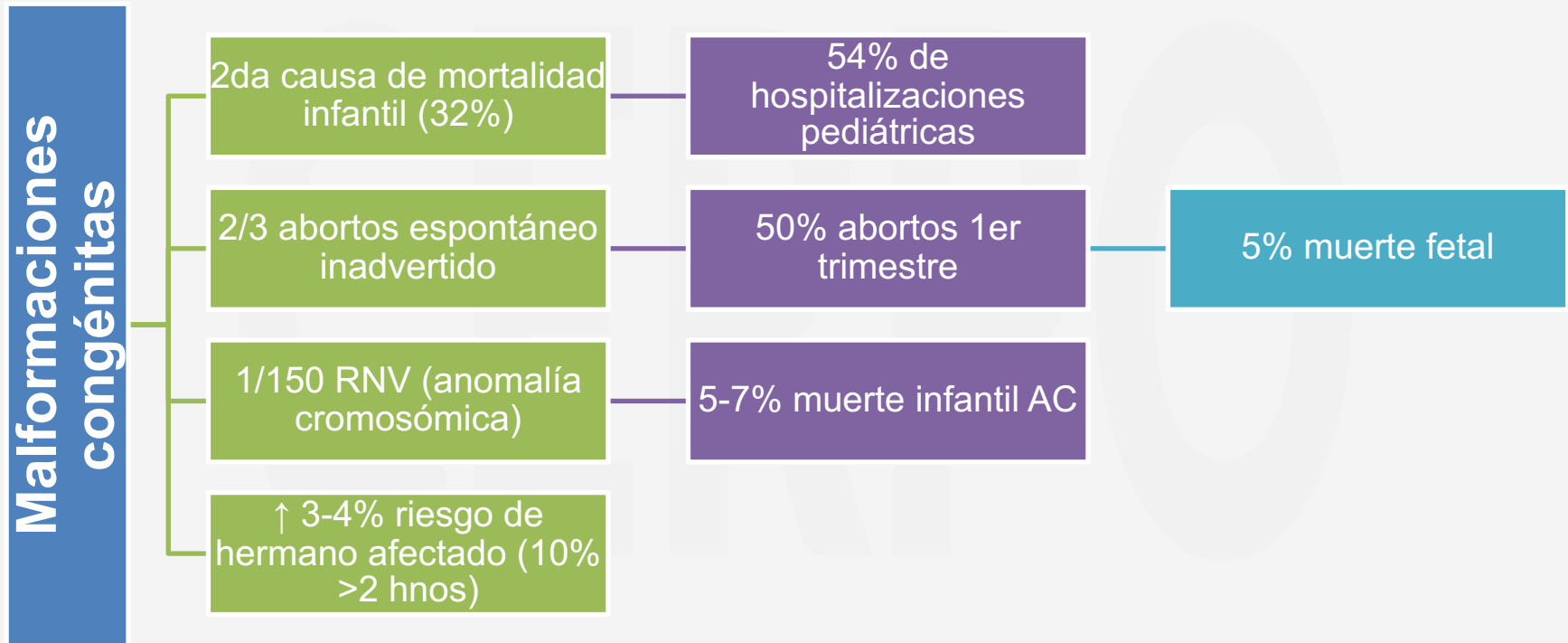


CUANDO OFRECER



- A todas las mujeres embarazadas se les debe ofrecer una evaluación prenatal para detectar aneuploidías mediante pruebas de detección o diagnóstico, independientemente de la edad materna u otros factores de riesgo
- El asesoramiento previo a la prueba debe ser un proceso de toma de decisiones compartida y debe incluir una discusión sobre el riesgo del paciente de sufrir aneuploidía y otras enfermedades genéticas

IMPORTANCIA DE LOS TEST GENÉTICOS



TIPOS DE TEST GENETICOS



Cariograma

FISH

MLPA

QF-PCR

Microarray

EXOMA

QF-PCR (Quatitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)



- Amplificación exponencial de segmentos específicos de ADN (Short Tandem Repeats / marcadores microsatélites) de los cromosomas estudiados.
- **Objetivo:** diagnóstico rápido de aneuploidías más comunes (T13, T18, T21 y aneuploidías sexuales). También es capaz de detectar triploidías y algunas tetraploidías.

QF-PCR (Quatitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)



- **Ventajas:**

- Permite detectar la contaminación celular materna en una muestra fetal.
- Resultados en 24-48 hrs.
- No requiere cultivo celular
- Buena relación costo-beneficio
- Especificidad reportada hasta 100%. VPP 100%, VPN 99,7%.

- **Limitaciones:**

- Estudio restringido a 5 cromosomas.
- No detecta monosomías (excepto Turner).
- No detecta mosaicos cuando son de bajo grado.
- Si QF-PCR normal → Microarray o cariotipo (riesgo residual 0.05% de fenotipo alterado en pacientes de bajo riesgo)

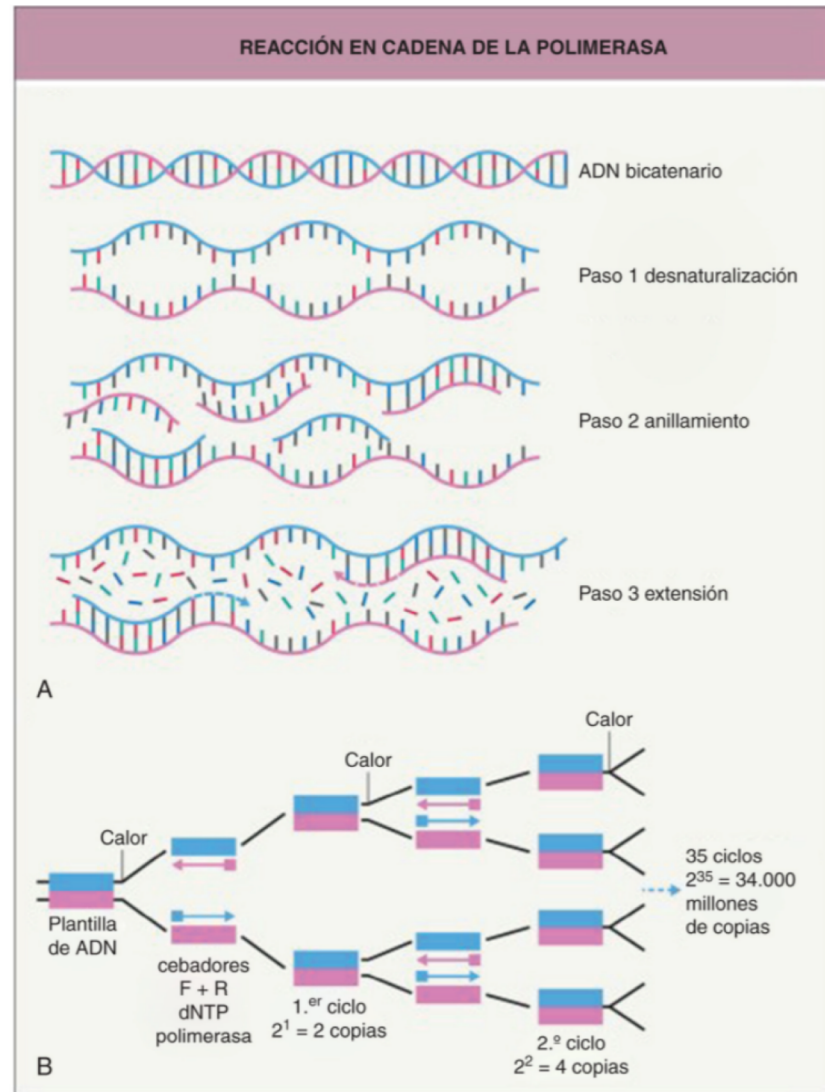


FIG. 6.3 La PCR implica la utilización de cebadores, nucleótidos y polimerasa, así como la aplicación de ciclos de calentamiento y enfriamiento en los que la polimerasa prolonga la cadena de nucleótidos duplicando el contenido de ADN con cada ciclo. Tomada de Jean L. Bolognia, Joseph L. Jorizzo, Julie V. Schaffer, *Dermatology*. 2012. Elsevier.

MICROARRAY (CARIOTIPO MOLECULAR)



- Método de análisis genético de todo el genoma, con una resolución de 10 a 1000 veces superior a la del cariotipo convencional.
- Puede no detectar algunos casos de mosaicismo, si éste no está presente en la muestra celular analizada o cuando una de las dos líneas se encuentra presente en un porcentaje inferior al 20%.
- El microarray tiene más capacidad de detección en comparación con el cariotipo convencional en todas las indicaciones de prueba invasiva. En caso de **malformación ecográfica**, permite detectar un **6-8% adicional de anomalías por encima del cariotipo**. Esta tasa varía en función del tipo de malformación y puede ser de hasta el **17% en caso de cardiopatías congénitas**.

MICROARRAY (CARIOTIPO MOLECULAR)



- Array-CGH:
 - Es el más utilizado prenatalmente. Consiste en la hibridación competitiva de dos ADNs marcados diferentemente, un ADN de referencia y el ADN fetal, sobre un soporte sólido con sondas de ADN ordenadas en función de su posición en el genoma y, por tanto, permite detectar ganancia o pérdida de material genético.
- Array-SNP
 - Microarray de SNPs o “single nucleotid polymorphisms”: compara la intensidad de hibridación del ADN fetal con una señal control determinado previamente.

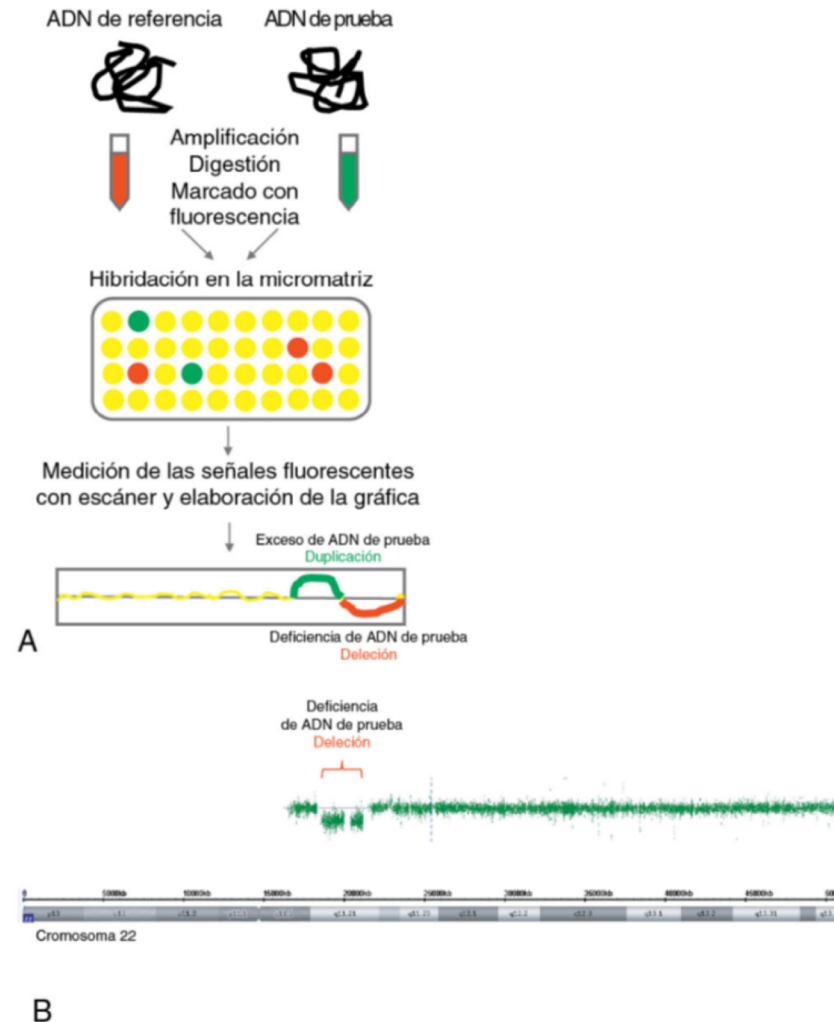


FIG. 12.1 Proceso de hibridación genómica comparativa en matriz (aCGH). La parte A muestra el proceso de aCGH, que permite la determinación de la proporción entre el ADN de referencia y el de prueba en cada oligonucleótido en la matriz. Esta proporción muestra cuándo existe un exceso o deficiencia de ADN de prueba y se utiliza para identificar desequilibrios, como aneuploidía de un cromosoma completo, o bien microdelecciones o duplicaciones. El color rojo significa una pérdida del ADN de prueba y el verde corresponde a una ganancia de ADN de prueba. La parte B muestra la imagen real generada de la gráfica del número de copias de una plataforma de aCGH en un caso con una delección de unas 3 Mb de 22q11.2.

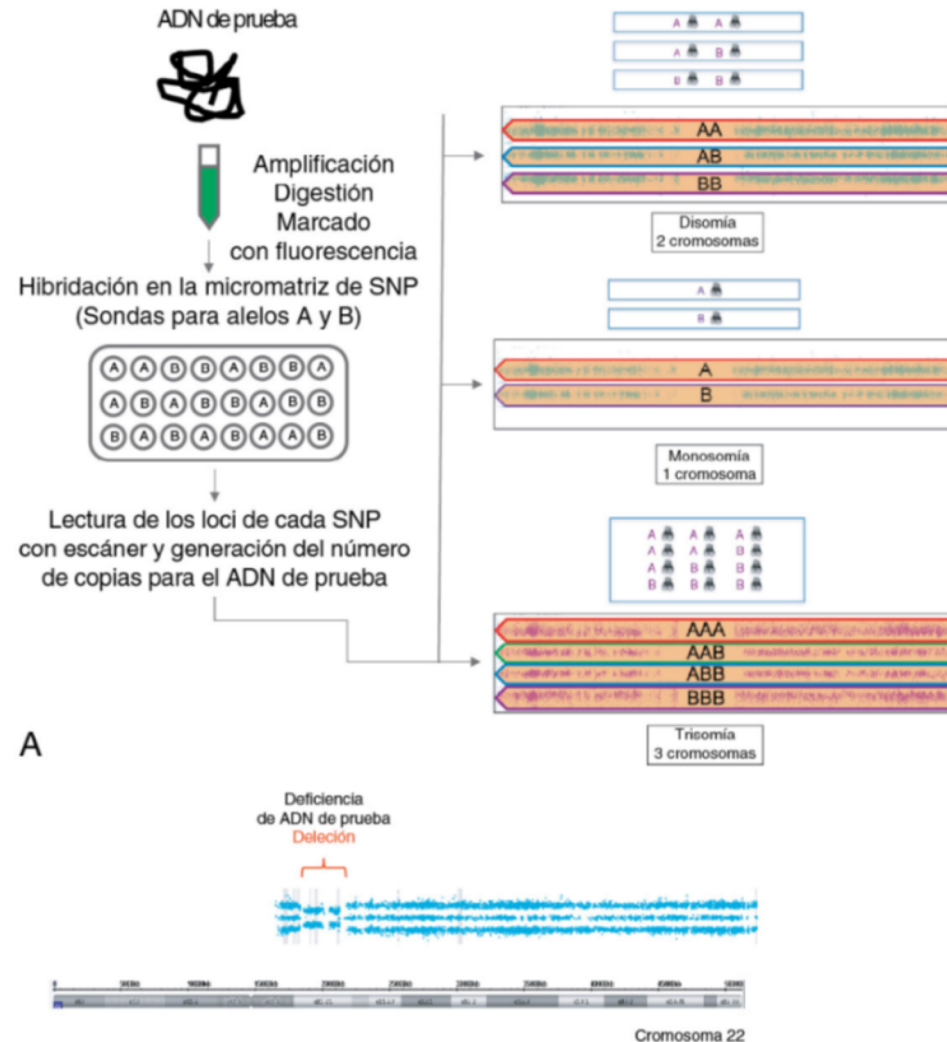


FIG. 12.2 La parte A muestra el proceso de matriz de SNP, que permite la determinación del alelo en cada locus de la matriz. A continuación, los alelos se utilizan para determinar el número de copias con el fin de identificar desequilibrios, como aneuploidía de un cromosoma completo, o bien microdeleciones o duplicaciones. La parte B muestra la imagen real generada a partir de una plataforma de matriz de SNP.

MICROARRAY (CARIOTIPO MOLECULAR)



- **Indicaciones:**
 - Translucencia nucal > 3,5 mm ↑ Detección de anomalías en 5% (con cariotipo normal)
 - Anomalías congénitas múltiples sin un patrón reconocible → Primera línea
 - Cariograma / FISH normal → Alterado en 6-10% (vs. 0,4-2,0% sin anomalías estructurales)
 - Mejorar definición de hallazgos encontrados en otras técnicas → CNV en citogenética tradicional
 - Cuando no hay sospecha clara de síndrome monogénico
 - Óbito fetal

MICROARRAY (CARIOTIPO MOLECULAR)



- **No detecta:**
 - Síndromes por mutaciones puntuales, triploidías ni tetraploidías
 - Reordenamientos balanceados (translocación / inversión)
 - CNV (deleción/duplicación) muy pequeñas
Depende de resolución del array
 - Mosaicismo bajo → $< 20\%$ (o si no se obtiene muestra de la línea celular alterada)
 - Mutaciones no descritas → No se detectarán en un microarray convencional

NGS (Next generation sequencing)



- Conjunto de tecnologías que permiten la secuenciación rápida de nucleótido a nucleótido de grandes fragmentos de ADN de manera eficiente en un solo experimento.
- Compara el genoma con uno de referencia detectando diferencias, cambios de posición de un nucleótido o si faltan o sobran piezas

EXOMA

- Emplea NGS para determinar la secuencia de todos los exones codificantes de todos los genes del genoma, con interpretación posterior restringida a los 4.900 genes mórbidos OMIM asociados a un fenotipo clínico.
- El exoma representa solo el **1-2% del genoma** y contiene cerca del **85% de las variantes conocidas como causantes de enfermedad**. Se utiliza cuando una enfermedad o condición específica puede ser causada por variantes patogénicas en muchos genes desconocidos.

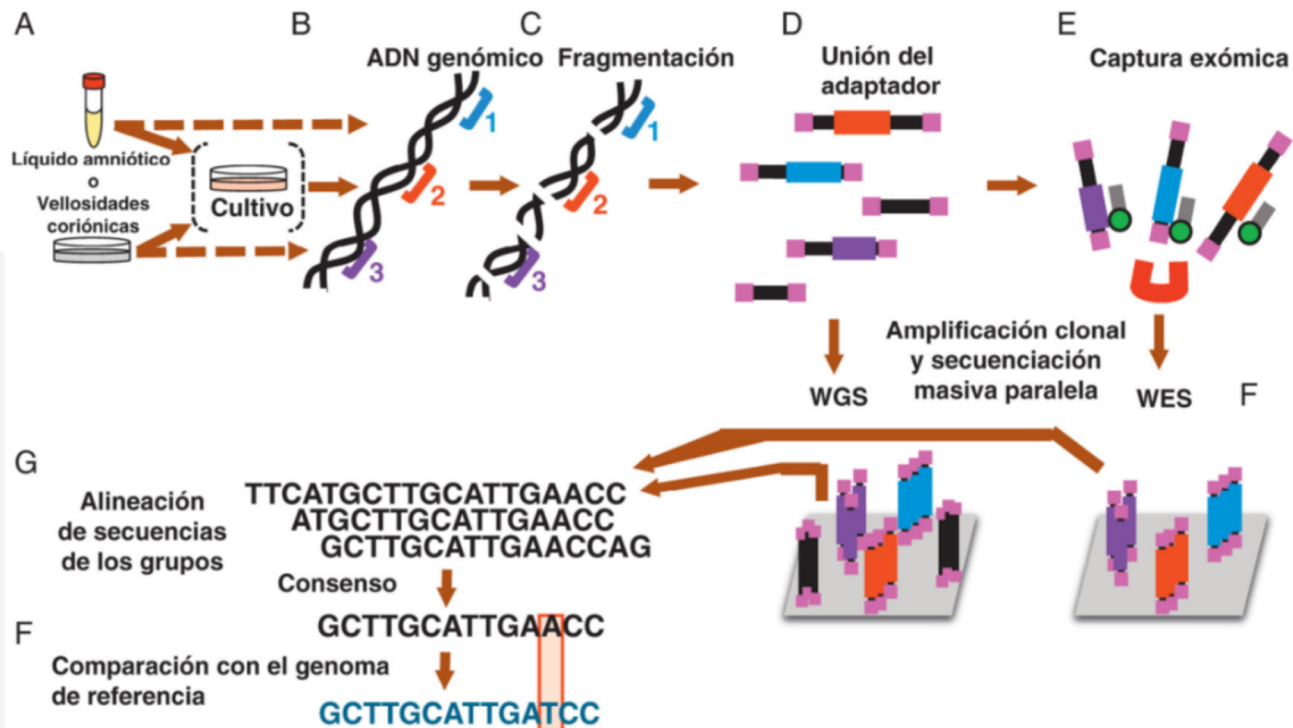


FIG. 13.1 Metodología de secuenciación de última generación . (A) Se obtiene líquido amniótico y vellosidades coriónicas mediante un procedimiento diagnóstico prenatal invasivo. **(B)** Se comienza un cultivo celular para obtener células fetales (trofoblasto) de las que extraer ADN. Si se dispone de material suficiente, se puede preparar ADN genómico en paralelo, mientras crecen los cultivos de «respaldo». A continuación, el ADN se fragmenta **(C)** en segmentos pequeños y se une a adaptadores **(D)** para preparar la genoteca de secuenciación. **(E)** Se añade un paso de captura para la secuenciación del exoma completo con el fin de purificar los exones mediante hibridación con una colección de cebadores, lo que permite purificar la genoteca de captura dirigida del resto del genoma. **(F)** Esto se sigue de la inmovilización en una plataforma sólida y la amplificación para formar grupos que se convierten en moldes para la secuenciación masiva en paralelo mediante la incorporación de nucleótidos marcados que pueden detectarse a medida que se añaden a la secuencia que se genera a partir del molde. **(G)** Las distintas secuencias solapadas se alinean para formar una secuencia consenso. **(F)** A continuación, esta última se compara con la secuencia de referencia para detectar la diferencia; en el ejemplo de la figura, existe un cambio T > A en la secuencia nueva.

TABLA 6.5
Resumen de las pruebas de genómica perinatal.

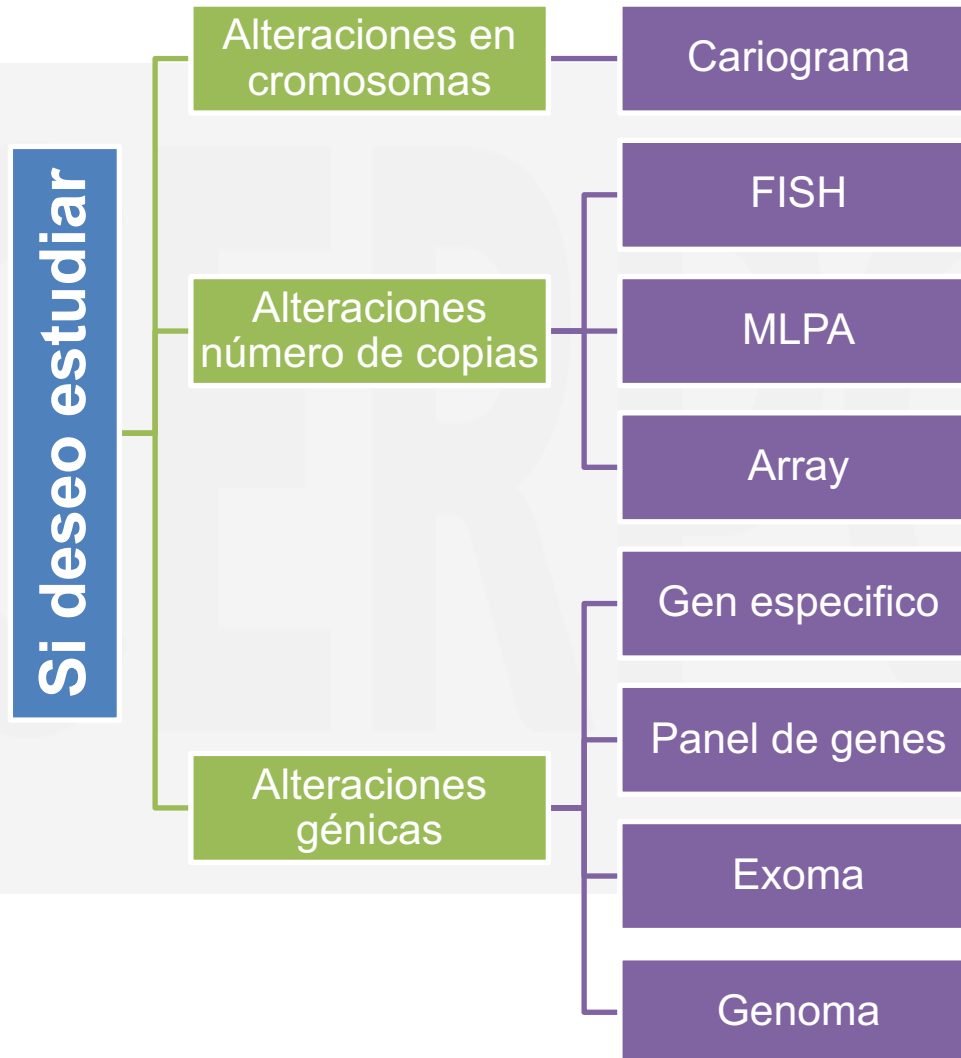
Tipo de prueba	Vellosidades coriónicas	Amniocitos	Células fetales nucleadas	ADN/ARN libre	Cuerpos polares	Biopsia de blastómero o de blastocisto	Potencial para análisis del genoma completo
Cariotipo	Sí	Sí	No	No	No	No	Sí
FISH	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No
PCR cuantitativa	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
SNP o micromatriz de hibridación genómica comparativa (CMA)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Secuenciación <i>shotgun</i> o secuenciación masiva en paralelo	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Secuenciación del exoma completo (WES)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Detección de variantes	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No

(Tomada de Bodurtha y cols., 2012)

TABLA 14.1
Pruebas disponibles para el diagnóstico genético prenatal

Prueba	Tiempo para obtener los resultados	Enfermedades detectadas	Comentarios
Cariotipo	7-14 d	Anomalías cromosómicas >5-10 Mb	Método tradicional para el diagnóstico de anomalías cromosómicas
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en interfase	24-48 h	Evaluación rápida de las principales aneuploidías (por lo general, cromosomas 13, 18, 21, X, Y)	Menos precisa con la biopsia de las vellosidades coriónicas frente a la amniocentesis
FISH en metafase	7-14 d	Microdeleciones y duplicaciones	Se puede utilizar para evaluar anomalías específicas cuando existe una sospecha clínica; suele preferirse el CMA
Análisis de micromatrices cromosómicas (CMA)	3-5 d (directo); 10-14 d (células cultivadas)	Variantes del número de copias (VNC) >50-200 kb	Análisis del genoma completo en busca de VNC Detecta las anomalías cromosómicas principales, excepto reordenamientos equilibrados y algunas triploidías
Análisis molecular del ADN	3-14 d (más rápido con el análisis directo que cuando se requieren células cultivadas)	Variantes genéticas cuya presencia se ha demostrado previamente en una familia o sospechado en función de hallazgos ecográficos o de otro tipo	Por lo general, se trata de un análisis dirigido que se centra en un trastorno específico (o categoría de trastornos) cuya presencia se sospecha en un feto en función de los hallazgos ecográficos o los antecedentes familiares
Paneles génicos	10-14 días	Conjuntos de genes o regiones génicas que se asocian con características o fenotipos frecuentes, como displasia esquelética	A menudo no tan exhaustivos como el análisis dirigido de un solo gen
Secuenciación del exoma completo	Varias semanas a meses	Secuenciación de todos o la mayoría de los genes codificantes de proteínas en el genoma	A menudo difícil de interpretar en casos prenatales

EN RESUMEN





Seminario N°8: QF-PCR, Array y CGH. Técnica y aporte de su uso prenatal

Dra. Gabriela Rodríguez B.
Tutora: Dra. Catherine Díaz