

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"> – chromosome analysis (karyotyping) – molecular genetic diagnosis – biochemical diagnosis |
| Amniocentesis | 15–17 weeks | 0.5 %–1 % | <ul style="list-style-type: none"> – chromosome analysis – diagnosis of open neural tube defects – molecular genetic diagnosis – biochemical diagnosis |
| Placental biopsy | From 15 weeks | ~ 1% | <ul style="list-style-type: none"> – chromosome analysis – molecular genetic diagnosis – biochemical diagnosis |
| Cordocentesis | from 16–20 weeks ^{*1} | ~ 1 % | <ul style="list-style-type: none"> – chromosome analysis – hematological and biochemical diagnosis |
| Fetal biopsy | from 20 weeks | ^{*2} | <ul style="list-style-type: none"> – diagnosis of specific genetic dermatoses |



*1 ...

Tipos de pruebas genéticas disponibles



- Citogenéticas
- Bioquímicas
- Moleculares

Pruebas citogenéticas



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

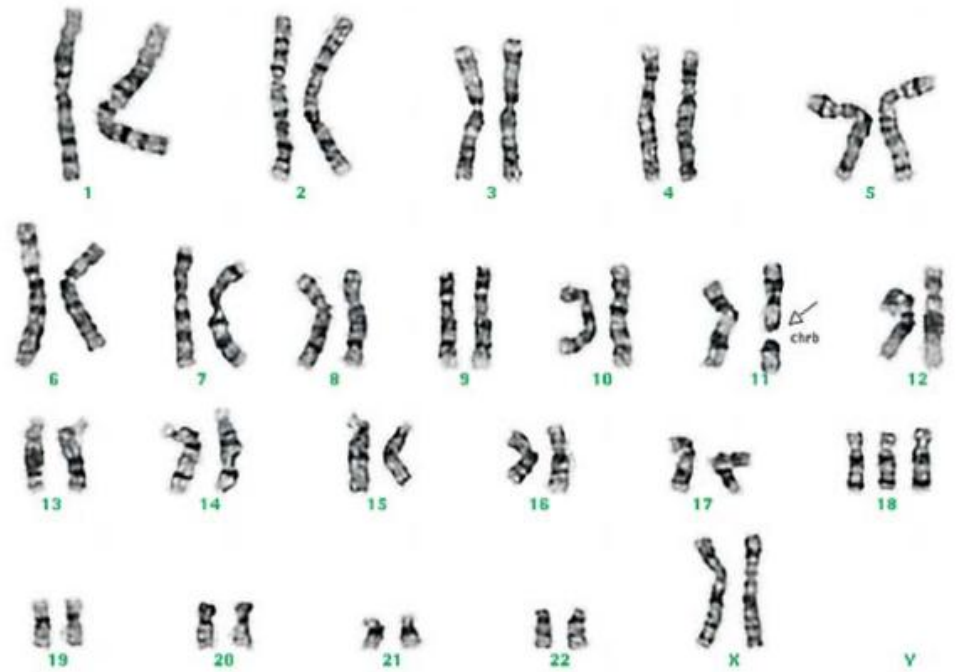


Figure 2: Karyotype of a fetus with trisomy 18. Three copies of chromosome 18 can be seen. One copy of chromosome 11 shows a break (see arrow) consistent with a preparation artefact

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).

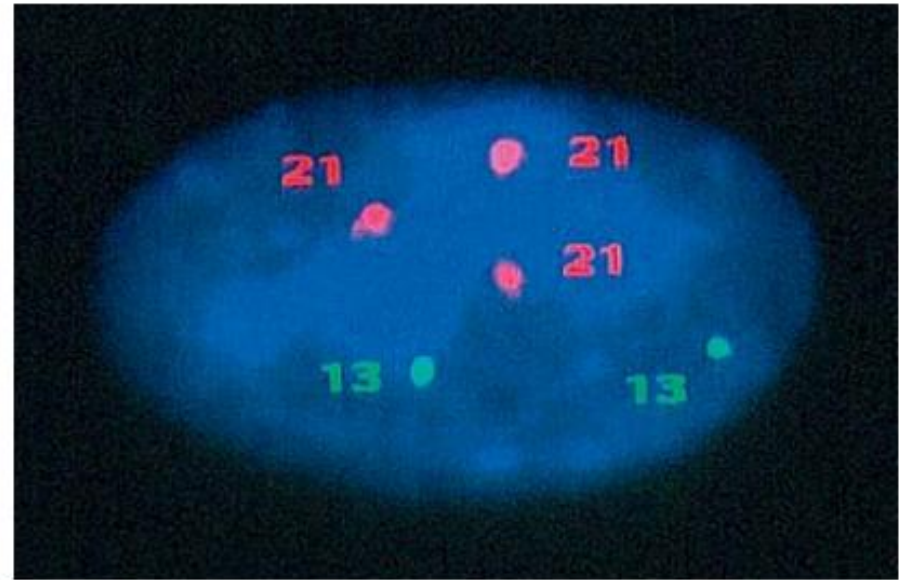


Figure 3: Demonstration of Down syndrome (trisomy 21) in a prenatal rapid diagnostic test using FISH analysis with probes specific for chromosomes 13 (green) and 21 (red). The three red signals confirm trisomy 21

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



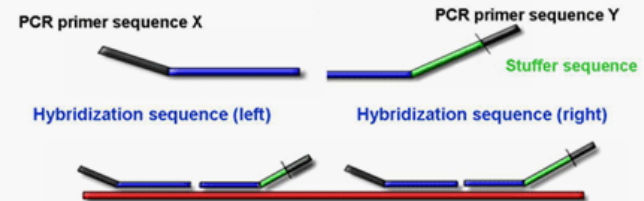
- Análisis de micromatrices de proteínas.
- Determinar la cantidad de proteínas presentes en una muestra biológica.
- Hibridación de proteínas marcadas en una muestra del paciente se mide en comparación con la muestra de referencia.
- Presencia, ausencia, aumento o reducción de una proteína



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.

