
PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

ESTUDIS GENÈTICS EN MOSTRES FETALS

Hospital Clínic | Hospital Sant Joan de Déu | Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

El **genoma** és la informació genètica que un organisme hereta dels seus pares i que caracteritza un individu. El genoma està organitzat en unitats anomenades cromosomes. El genoma humà conté 23 parells de cromosomes. Un **cromosoma** està compost per una doble cadena d'ADN associada a proteïnes i conté la informació genètica dividida en unitats d'informació anomenades gens. Un **gen** és el fragment més petit d'una molècula d'ADN i posseeix informació completa per a un caràcter determinat. El genoma humà està format per 3.000 milions de parells de bases (Mb) i conté uns 23.000 gens localitzats que es disposen de forma lineal al llarg dels cromosomes. Les anomalies genètiques es poden dividir en 3 grans grups: anomalies cromosòmiques, anomalies submicroscòpiques i anomalies monogèniques.

1.- Les **anomalies cromosòmiques** es defineixen com una alteració en el nombre o en l'estructura dels cromosomes detectables al cariotip. Generalment les anomalies cromosòmiques no són malalties hereditàries, i per tant tenen un baix risc de recurrència. Podem distingir entre:

- **Anomalies cromosòmiques numèriques.** L'anomalia cromosòmica més freqüent i compatible amb la vida és la trisomia del cromosoma 21 (síndrome de Down) i la segueixen en freqüència la trisomia 18 (síndrome d'Edwards) i la 13 (síndrome de Patau). De monosomies completes només se'n coneix una que sigui compatible amb la vida, la monosomia del cromosoma X (45,X) o síndrome de Turner. Durant el període prenatal també són freqüents les poliploidies, caracteritzades per la presència d'una dotació cromosòmica completa extra, principalment la triploidia.
- **Anomalies cromosòmiques estructurals** s'originen per una reconstrucció anòmala després d'un o diversos trencaments cromosòmics en un únic o més d'un cromosoma. Els reordenaments estructurals es classifiquen en desequilibrats o equilibrats en funció de si es perd o guanya material genètic o pel contrari no hi ha alteracions de dosi. Al voltant d'un 4% dels casos de síndrome de Down són causats per la presència d'una translocació robertsoniana en un dels progenitors.

2.- Les **síndromes de microdeleció i microduplicació**, també anomenades anomalies submicroscòpiques, perquè no es veuen al cariotip, o variacions en el nombre de còpies (CNV), són anomalies genètiques que involucren fragments genòmics entre 10kb i 10Mb. Aquestes síndromes clíniques estan causades per una deleció o duplicació que involucren diversos gens i les més freqüents són la síndrome de Di George (del22q11.2), Williams (del7q11.23) o Prader-Willi (del15q11-13) i un nombre creixent de síndromes de microdeleció i microduplicació que s'estan descrivint en l'actualitat.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

3.- Malalties monogèniques: malalties causades per variants genètiques patogèniques (mutacions) o canvis en l'estructura d'un únic gen que dona lloc a una proteïna alterada o a la seva manca. Les malalties monogèniques es divideixen en funció del seu patró d'herència en:

- **Autosòmiques dominants:** es farà un diagnòstic prenatal quan un progenitor estigui afectat, ja que hi ha un risc d'un 50% de transmissió al fetus. També s'ofereix el diagnòstic prenatal després de l'aparició d'un cas "de novo" en un fill previ, ja que encara que el risc de recurrència és inferior al 5%, podria existir un mosaïcisme germinal en un dels progenitors. Alguns exemples de malalties amb herència autosòmica dominant més freqüents en la nostra població són la síndrome de Noonan, la neurofibromatosi, l'esclerosi tuberosa, la malaltia de Huntington, la distròfia miotònica (Steinert), la síndrome de Marfan i l'acondroplàsia
- **Autosòmiques recessives.** Requereixen que ambdós progenitors siguin portadors (sans) o afectes de la malaltia. En el cas més freqüent de portadors sans, no hi ha casos en generacions prèvies. Les parelles consanguínies tenen un major risc de malalties recessives, així com algunes ètnies on l'endogàmia és freqüent. L'evolució tecnològica actual permet a una parella la realització d'un **cribratge genètic de portadors** que analitza fins a uns 600 gens, i pot determinar així el risc de tenir un fill amb una malaltia genètica recessiva, a causa de l'estat de portador dels seus progenitors. En una parella consanguínia, s'hauria de descartar el caràcter de portador per a les malalties recessives més freqüents en la seva població. Alguns exemples de malalties amb herència recessiva més freqüents en la nostra població són la fibrosi quística, la hiperplàsia suprarenal congènita, la beta-talasèmia (detectable en un hemograma), l'atròfia muscular espinal i la malaltia de Gaucher.
- **Lligades al cromosoma X.** Són les anomenades malalties lligades al sexe causades per un gen localitzat en el cromosoma X. Habitualment una mare sana, però portadora, transmet el cromosoma X amb l'alteració al 50% de la seva descendència i el 50% dels homes estaran afectats per la malaltia i el 50% de les dones en seran portadores sanes. De tota manera, les dones també poden estar afectades, encara que habitualment en menor grau, a causa del fenomen de la inactivació preferencial del cromosoma X o d'una herència lligada al sexe dominant. Algunes de les malalties amb herència lligada al X més freqüents en la nostra població són la síndrome de X-fràgil, la distròfia muscular de Duchenne i l'hemofília A i B.

Els **tests genètics** prenatals són proves dirigides a l'anàlisi del genoma fetal amb la finalitat d'identificar la causa genètica d'una determinada malaltia. En cas d'antecedents familiars caldrà tenir identificada la mutació causant de la malaltia a la família abans de fer l'estudi prenatal. Hi ha diverses tècniques de diagnòstic genètic prenatal i cada test proporciona una informació específica diferent. Així doncs, en cada cas s'haurà d'escollir un test específic, basant-se en la sospita diagnòstica, l'acceptació de la gestant en funció del seu risc individual i de les seves preferències.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

1. QF-PCR (Quatitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)

La QF-PCR quantifica el nombre de cromosomes 13, 18, 21, X i Y mitjançant l'estudi de diverses seqüències d'ADN polimòrfiques anomenades repeticions curtes en tàndem ("short tàndem repeats: STR") o marcadors microsatèl·lits, localitzades al llarg de cada un dels 5 cromosomes estudiats. L'objectiu de la QF-PCR és el diagnòstic ràpid de les **aneuploïdies més comunes** que són les que impliquen aquests 5 cromosomes (trisomia 13, trisomia 18, trisomia 21 i les aneuploïdies de cromosomes sexuals). També és capaç de detectar triploïdies i algunes tetraploïdies.

La QF-PCR permet detectar la **contaminació cel·lular materna** en una mostra fetal. És recomanable descartar la contaminació materna a partir d'una mostra materna, ja sigui procedent de glopeig bucal o de sang en situacions on n'hi hagi un risc incrementat de contaminació materna, com ara cariotips en vellositats corials d'avortaments diferits, amniocentesis transplacentàries o en líquids hemàtics.

La QF-PCR és capaç de detectar si la no disjunció causant d'una trisomia és d'**origen** meiótic i per tant present en el zigot (presència de tres al·lels en relació 1:1:1 per almenys un dels marcadors estudiats) o probablement mitòtic i per tant post-zigòtic (presència de 2 al·lels diferents en relació 2:1 per tots els marcadors estudiats). L'estudi amb QF-PCR dels progenitors permet conèixer l'**origen parental** de les triploïdies, digínic o diàndric (associada a una mola parcial), així com del cromosoma en excés en una trisomia o en defecte en la monosomia X. En cas de disomia uniparental (androgonètica) completa pot diagnosticar una mola completa. En el cas d'una gestació múltiple, la QF-PCR és capaç de detectar la **zigositat dels bessons**, ja que el patró d'amplificació STR de tots els marcadors de bessons monozigòtics serà idèntic.

Els principals **avantatges** d'aquesta tècnica són:

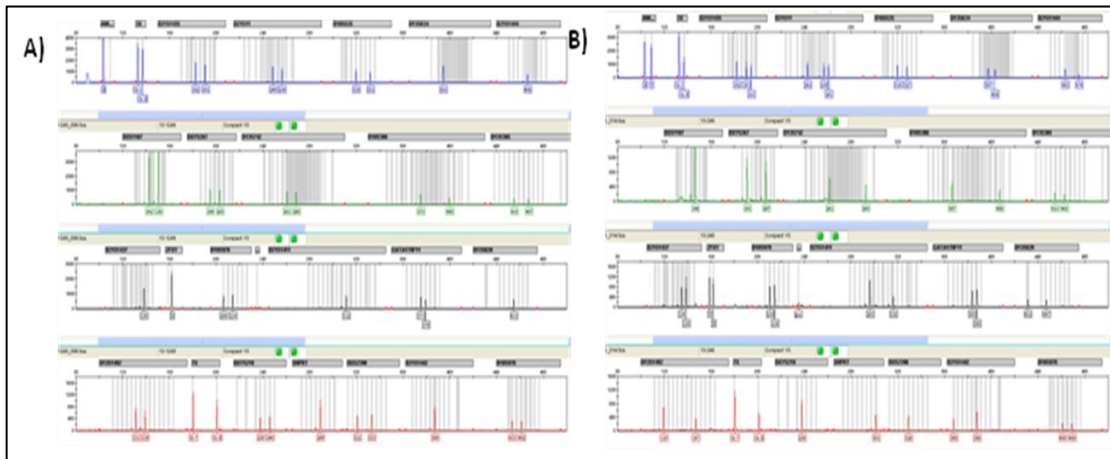
- la seva rapidesa (resultats estan disponibles en 24-48 hores)
- el reduït volum de mostra requerit
- el no requeriment de cultiu cel·lular
- un processament automatitzable
- l'obtenció d'un resultat en més del 99% de les mostres
- una interpretació relativament senzilla
- una bona relació cost-benefici

Entre les seves **limitacions** es troben:

- un estudi restringit a 5 cromosomes
- no detecció de monosomies a excepció de la síndrome de Turner (ja que hi ha dos marcadors que ens permet calcular el nombre total de cromosomes sexuals).
- la no detecció de mosaics quan són de baix grau (<20%) o la mostra presenta contaminació materna
- no es poden filiar les trisomies autosòmiques com a trisomia lliure o trisomia per translocació

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

La QF-PCR ha demostrat ser una tècnica molt robusta i acurada, i tot i que no requereix confirmació mitjançant una altra tècnica, no s'utilitza habitualment de forma aïllada. Després d'un resultat normal de la QF-PCR és aconsellable realitzar o bé un microarray o bé un cariotip convencional, ja que existeix un risc residual del 0.05% d'un fenotip desfavorable després d'una QF-PCR normal en casos de baix risc d'aneuploïdia. En el nostre centre és l'única anàlisi cromosòmica que realitzem en els casos de teràpia de bessons monocorials, quan són gestacions de baix risc d'aneuploïdia. També pot acompanyar a estudis moleculars, PCR per infeccions fetals o en l'amenaça de part prematur.



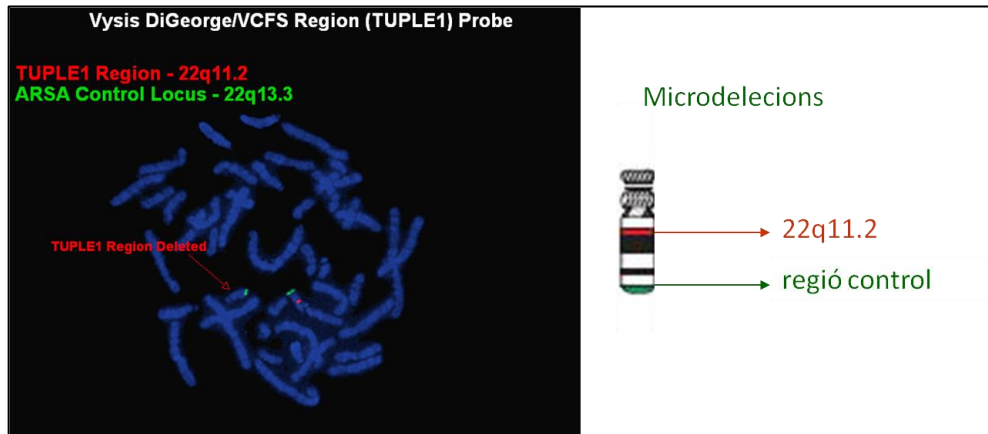
QF-PCR: A) Fetus de sexe femení amb una dotació normal per als cromosomes 13, 18, 21 i sexuals:
B) Fetus de sexe masculí amb una trisomia 21.

2. FISH (Fluorescent in situ hybridization)

L'anàlisi mitjançant sondes FISH es pot realitzar en nuclis interfàsics, si hi ha prou cèl·lules, o en cromosomes metafàsics després d'un cultiu cel·lular. L'estudi FISH s'ha utilitzat en diagnòstic prenatal amb 3 finalitats principals:

- Caracterització cromosòmica: útil davant la troballa de reorganitzacions cromosòmiques o de cromosomes marcadors (d'origen desconegut). Actualment substituït pel microarray.
- Estudi de microdeleccions: s'ha utilitzat per alteracions específiques, com la síndrome de DiGeorge (del22q11.2) o la síndrome de Williams (del7q11.23). Cada microdelecció requereix d'una sonda específica. Està sent reemplaçat en l'actualitat pel microarray, a excepció dels estudis parentals.
- Diagnòstic ràpid d'aneuploïdies típiques amb la utilització d'una sonda per a cadascun dels següents cromosomes 21,18,13, X i Y sobre nuclis interfàsics sense cultivar. S'ha substituït per la QF-PCR, ja que aquesta última tècnica presenta alguns avantatges (detecció de contaminació materna, zigositat en múltiples, origen dels al·lels parentals ...)

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS



FISH: Estudi de la microdelecció 22q11.2.

3. CARIOTIP

El **cariotip o estudi citogenètic** consisteix en l'anàlisi del nombre i estructura de tots els cromosomes en metafase, mitjançant l'estudi del patró de bandes específic per a cada cromosoma. Mostra la dotació cromosòmica completa en una única prova i per tant es considera una anàlisi del genoma complet ("genomewide"), similar al microarray i a diferència de la QF-PCR, FISH o MLPA (Multiplex Ligations Probe Amplification), el cariotip permet la identificació de totes les anomalies cromosòmiques numèriques (incloent-hi les aneuploïdies autosòmiques i sexuals), i les anomalies estructurals amb un segment cromosòmic involucrat superior a les 5-10 Mb (incloent-hi translocacions equilibrades, translocacions desequilibrades, delecions, duplicacions, inversions i insercions).

El **processament** de la mostra i la realització del cariotip són manuals en gran mesura, i la seva interpretació requereix personal expert. El nombre de bandes mínim per a un cariotip prenatal pot variar entre 250-400, en funció del teixit d'origen i de la indicació de l'anàlisi. Habitualment l'estudi cromosòmic es basa en 20 metafases. Quan el nombre de metafases analitzables és inferior, el resultat serà subòptim i haurà d'indicar-se en l'informe. La precisió diagnòstica del cariotip és superior al 99% per a les aneuploïdies i anomalies cromosòmiques estructurals amb desequilibris superiors a 5-10Mb. Presenta una bona relació cost-benefici.

Existeixen 3 **mètodes d'obtenció de metafases** a partir de mostres fetals:

1- **Cultiu curt o mètode semidirecte en vellositats corials:**

A partir de les cèl·lules del trofoblast, que es repliquen espontàniament, es pot obtenir un cariotip en 3-7 dies. Aquest és el tipus cel·lular majoritari que origina l'ADN fetal lliure circulant en plasma matern estudiat en els test d'aneuploïdia no invasius. La fallada de cultiu és excepcional si es disposa d'una quantitat mínima de vellositats. No presenta risc de contaminació materna, ja que les cèl·lules maternes no es repliquen espontàniament, però presenta un risc del 2% de detectar anomalies confinades a la placenta,

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

específicament al trofoblast. Té un risc d'1/3000 de falsos negatius (anomalia present en el fetus amb un cariotip normal de vellositats corials). S'hauria de fer sempre un cultiu llarg de vellositats corials per confirmar-ne els resultats. En molts centres el cultiu curt en vellositats corials s'ha substituït per la QF-PCR.

2- Cultiu llarg (vellositats corials o líquid amniòtic):

Consisteix en un cultiu cel·lular de 10-15 dies de durada necessari per obtenir prou metafases de cèl·lules mesenquimals provinents de les vellositats corials o de cèl·lules de descamació presents en el líquid amniòtic. Els cromosomes que s'obtenen acostumen a tenir més qualitat de bandes que els de cultiu curt. La fallada del cultiu és més freqüent quan la mostra prové d'un exitus fetal, però és excepcional en mostres de vellositat corial o de líquid amniòtic en fetus viables. Existeix un risc de contaminació materna si es cultiven inadvertidament cèl·lules maternes. En comparació amb el cultiu curt, el cultiu llarg té menys falsos negatius i presenta una menor possibilitat de detectar una anomalia confinada a la placenta, de manera que en els casos en que s'hagi realitzat un cultiu curt de vellositat corial es recomana realitzar sempre un cultiu llarg.

3- Cultiu de sang fetal:

Es realitza un cultiu similar al de la sang perifèrica postnatal que consisteix en l'estimulació dels limfòcits.

Es pot donar el cas que un estudi citogenètic no detecti un **mosaïcisme** si les diverses línies cel·lulars no són presents en la mostra obtinguda per a l'anàlisi, o bé si es tracta d'un mosaïcisme de baixa freqüència. Així doncs, un mosaic del 20% es detecta en un 99% dels casos, si s'aconsegueixen estudiar un mínim de 20 metafases. En cas de sospita o troballa d'un mosaïcisme serà recomanable estudiar un mínim de 50 metafases. En cas d'hèrnia diafragmàtica, s'estudiaran 50-100 metafases/nuclis en el cariotip/FISH en líquid amniòtic, ja que la tetrasomia 12p causant de la síndrome de Pallister-Killian que pot estar associada a l'hèrnia diafragmàtica es troba habitualment en mosaic.

Discrepàncies fetus-placentàries: Els estudis citogenètics prenatals en vellositats coriòniques han posat en evidència l'existència de discrepàncies fetus-placentàries en un 1-2% dels casos. Així doncs cal confirmar alguns cariotips anòmals detectats en les mostres de vellositats, en cèl·lules d'origen estrictament fetal com són les del líquid amniòtic. Es consideren resultats fiables les anomalies homogènies (no mosaics) següents:

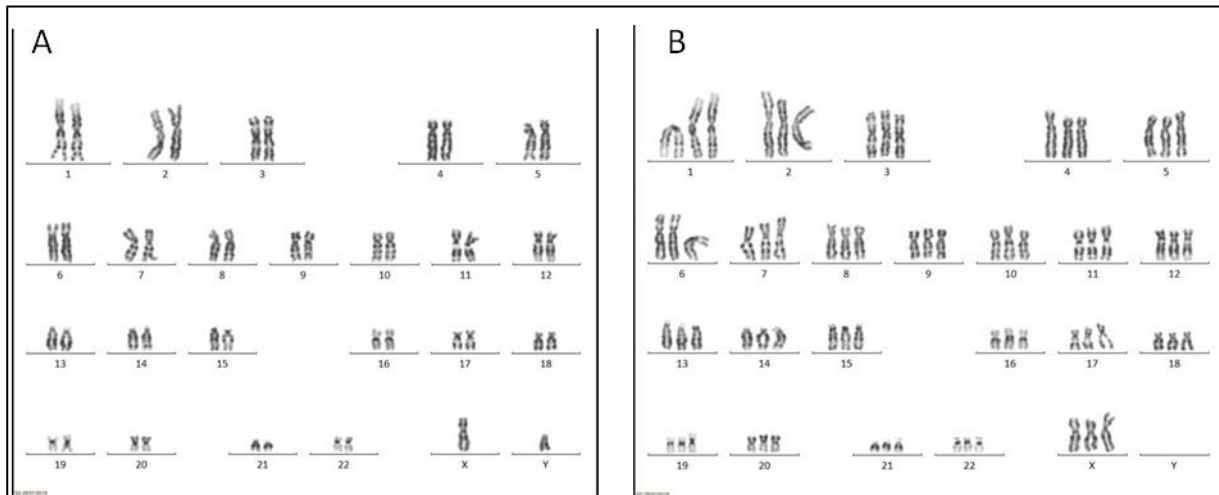
- trisomia 21,
- trisomies dels cromosomes sexuals (47,XXX, 47,XXY, 47,XYY),
- triploïdies
- anomalies estructurals familiars.

Pel contrari, cal comprovar en líquid amniòtic, en absència de signes ecogràfics fetals relacionats amb l'anomalia:

- la resta d'anomalies homogènies (trisomies 13 i 18, i monosomia X)
- qualsevol anomalia en mosaic amb una línia cel·lular normal

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

Aquestes recomanacions s'apliquen tant si l'anomalia es troba només en el cultiu curt (sospita mosaic confinat a la placenta, MCP tipus 1), només en el cultiu llarg (sospita MCP tipus 2), o en els dos cultius (sospita MCP tipus 3). I també si es troba en la QF-PCR, en cas que aquesta tècnica substitueixi el cultiu curt.



*Cariotips: A) Fetus de sexe masculí amb un cariotip normal:
B) Fetus de sexe femení amb una triploïdia 69,XXX.*

En l'actualitat el cariotip està sent substituït pel microarray en tots els procediments invasius a excepció dels casos de diagnòstic per QF-PCR d'una trisomia 21, 13 o una monosomia X. En aquests casos es preferible cancel·lar el microarray i realitzar un cariotip perquè informará si es tracta de una trisomia lliure o d'una trisomia per translocació i si la monosomia X està en línia pura o en mosaic.

4. MICROARRAY O CARIOTIP MOLECULAR

El **microarray cromosòmic** també anomenat micromatriu, cariotip molecular o simplement array, és un mètode d'anàlisi genètica de tot el genoma, amb una resolució de 10 a 1000 vegades superior a la del cariotip convencional, ja que detecta anomalies a partir de 10Kb -1Mb, en funció de la resolució escollida. Permet identificar tant les aneuploïdies, com els canvis submicroscòpics que no detectaríem mitjançant cariotip convencional.

Hi ha dues **tecnologies principals de microarray**:

- Microarray d'hibridació genòmica comparada (array-CGH). És el més utilitzat prenatalment. Consisteix en la hibridació competitiva de dos ADNs marcats diferentment, un ADN de referència i l'ADN fetal, sobre un suport sòlid amb sondes d'ADN ordenades en funció de la seva posició en el genoma i per tant permet detectar guany o pèrdua de material genètic.
- Microarray d'SNPs o "single nucleotid polymorphisms": compara la intensitat d'hibridació de l'ADN fetal amb un senyal control determinat prèviament.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

Les sondes d'ADN que actualment s'utilitzen els arrays-CGH són oligonucleòtids. Aquestes sondes es seleccionen en funció de 2 criteris, ja que es combinen:

- sondes distribuïdes al llarg de tot el genoma, amb una separació uniforme ("backbone coverage")
- sondes amb una major densitat en les regions causants de trastorns coneguts ("hot spots")

Qualsevol **mostra fetal** amb prou ADN és vàlida per al microarray, com ara les vellositats corials, el líquid amniòtic, la sang o un altre teixit o fluid fetal. S'aconsella l'extracció de 15-20 cc de líquid amniòtic (30 cc en cas de polihidramni) o 20-40 mg de vellositat corial. És convenient d'establir sempre un cultiu de reserva, tant per si cal extreure més ADN (més sovint en líquid amniòtic que en vellositats corials), en casos on la mostra inicial presenta contaminació materna, o per a realitzar tècniques de confirmació diagnòstiques posteriors.

El **temps de resposta** d'un microarray realitzat directament sobre la mostra és de 7-10 dies i si requereix cultiu en cas de no haver-se obtingut prou ADN serà de 2 setmanes addicionals.

Les pèrdues i guanys de material genètic que detecta el microarray es denominen **variacions en el nombre de còpies (CNV)**. De tota manera, el microarray no detecta ni les alteracions de seqüència de l'ADN, ni les mutacions puntuals, ni les reorganitzacions equilibrades. Segons la seva rellevància clínica les CNV es classifiquen en:

- CNVs benignes: presents en població general, també anomenades polimorfismes
- CNVs patogèniques o probablement patogèniques: associades a fenotips anòmals. Poden presentar penetrància incompleta (no tots els individus que porten la CNV presenten la malaltia) o expressivitat variable (la presentació de la malaltia té una expressió variable).
- CNVs incertes (VUS): quan no hi ha prou evidència en la literatura o en les bases de dades de la seva presència en població general sana, ni de la seva associació amb fenotips anòmals.

De manera similar al cariotip, el microarray pot no detectar alguns casos de **mosaïcisme**, si aquest no està present a la mostra cel·lular analitzada o quan una de les dues línies es troba present en un percentatge inferior al 20%.

En diagnòstic prenatal, el microarray té més **capacitat de detecció** en comparació amb el cariotip convencional en totes les indicacions de prova invasiva. En cas de malformació ecogràfica, permet detectar un 6-8% addicional ("incremental yield") d'anomalies per sobre del cariotip. Aquesta taxa varia en funció del tipus de malformació i pot ser de fins el 17% en cas de cardiopaties congènites. En els casos en què s'ha realitzat el microarray sense una indicació mèdica clara o únicament per edat materna avançada, hi ha al voltant d'un 1% d'increment addicional de diagnòstic d'anomalies, explicable perquè les síndromes de microdelecció i microduplicació són, en conjunt, una causa molt rellevant de patologia prenatal detectable.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

Una anàlisi prèvia de **QF-PCR** al microarray permet:

- descartar les aneuploïdies comunes i triploïdies. És important recordar que l'array-CGH no detecta totes les triploïdies (69,XXX)
- determinar el sexe fetal
- descartar la contaminació cel·lular materna en les mostres.

El resultat de **QF-PCR** indicarà com s'ha de continuar l'estudi:

- En QF-PCR anòmala: no cal continuar amb el microarray. Serà més útil realitzar un cariotip adreçat a l'assessorament genètic per a futures gestacions (principalment en les trisomies 21 i 13 i monosomia X).
- Si la QF-PCR detecta contaminació materna: s'estudiaran diferents rentats del cultiu de reserva de la mostra prenatal fins que no es detecti contaminació materna i en aquest moment es realitzarà una segona extracció d'ADN per al microarray.
- En QF-PCR normal: es continua amb el microarray.

Encara que seria ideal obtenir **mostres dels progenitors** (sang, frotis bucal o saliva) al mateix temps que la mostra fetal, per poder esbrinar l'origen "de novo" o heretada d'un progenitor de qualsevol CNV trobada, aquesta no és una pràctica habitual. Davant la troballa de CNVs patogèniques d'expressivitat variable o de baixa penetrància, es cursen les mostres parentals a posteriori per determinar si són heretades o d'aparició "de novo".

Consentiment informat: Durant l'assessorament genètic pre-test s'ha d'informar de la política del centre en relació a la troballa de les diferents CNVs. Al nostre centre no s'informen ni les CNV benignes, ni les VUS en ecografia normal. En cas de VUS trobada en un fetus malformat, un comitè format "ad hoc" per genetistes i especialistes en Medicina Fetal decidiran si és important obtenir mostres parentals i informar-la a la parella. Cal informar de les CNVs patogèniques i probablement patogèniques. En el nostre centre donem l'opció a la parella de ser informats sobre les troballes incidentals que inclourien els següents tipus específics de CNV patogèniques:

- Alteracions responsables de malalties d'aparició tardana, tenint en compte que un dels progenitors pot ser portador de la mateixa alteració i presentar la malaltia abans que el seu fill.
- Malalties de baixa penetrància (només uns pocs individus dels que tenen un canvi genètic determinat presenten la malaltia).

Les troballes secundàries definides com aquelles variants buscades activament en 59 gens definits com "accionables" en la prevenció del càncer i malalties cardiovasculars no s'informen actualment en el nostre hospital.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

també al FISH o MLPA dirigits, però la capacitat de detecció global del microarray en recomana l'ús en cas de prova invasiva.

- 5- *Antecedent familiar de reordenament cromosòmic de risc per a la gestació en curs:*
 - a. translocació parental recíproca en equilibri o inversió pericèntrica:
 - b. deleció o duplicació críptica familiar amb risc de transmissió significatiu, penetrància i rellevància clínica
 - c. cromosomes marcadors presents en mosaic en un progenitor i heretables pel fetus, de caràcter potencialment patogènic
- 6- *Troballes en el cariotip fetal:*
 - a. translocació recíproca
 - b. inversió 'de novo' aparentment equilibrada
 - c. cromosoma marcador (especialment del tipus anell i marcador no satel·litzat). En aquests casos es recomana un microarray amb la màxima resolució possible.
- 7- *Pèrdua gestacional de 2n trimestre o èxitus fetal intrauterí:* El fet de no requerir un cultiu cel·lular permet aplicar-lo en cèl·lules no viables, que no creixerien en un cultiu, de manera que en cas d'èxitus fetal aquesta serà la tècnica d'elecció.

5. DIAGNÒSTIC PRENATAL MOLECULAR DE MALALTIES MONOGENÈTIQUES

En gestacions d'alt risc de malalties monogèniques, ja sigui per antecedents familiars o per troballes ecogràfiques, es pot realitzar un diagnòstic prenatal de la malaltia genètica "in utero", idealment quan hi ha un gen identificat i se'n coneix també la variant patogènica causant. Hi ha diverses tècniques de **diagnòstic molecular** que s'apliquen en funció de la sospita clínica i del tipus d'alteració causal i serà l'especialista de laboratori qui haurà de decidir quina és la tècnica més adequada per realitzar l'estudi en funció de la indicació de la consulta. Les indicacions d'estudis moleculars en troballes ecogràfiques son les següents:

1-Tests gènics específics en sospita d'una malaltia específica:

- a. Acondroplàsia/hipocondroplàsia: en cas de fèmur curt: <3 SD o (<2.5 SD i fèmur/peu < 0.85). Un angle femoral $> 130^\circ$ és el millor predictor d'acondroplàsia.
- b. Fibrosi quística: en cas d'hiperrecogenicitat intestinal/calcificacions intraabdominals múltiples. El panell actual de 50 mutacions té una cobertura del 83% dels casos de fibrosi quística de la nostra població. Caldrà indicar l'ètnia, perquè els panells poden adequar-se a l'ètnia. En cas que un progenitor sigui portador d'una mutació el gen *CFTR*, en l'altre progenitor s'haurà de seqüenciar tot el gen i fer estudi de CNVs del gen per assolir un 99% de detecció.
- c. Distròfia miotònica de Steinert: en cas de polihidramni sever (ILA >30)
- d. Smith-Lemli-Opitz: en la troballa d'hipospàdias + Doppler normal (<28 s.) o afegint-hi microcefàlia (<3 SD) (≥ 28 s.) és més senzill realitzar l'estudi bioquímic dels esterols que no pas la seqüenciació del gen.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

2- “Estudi de mutació coneguda” mitjançant seqüenciació clàssica Sanger en les següents situacions:

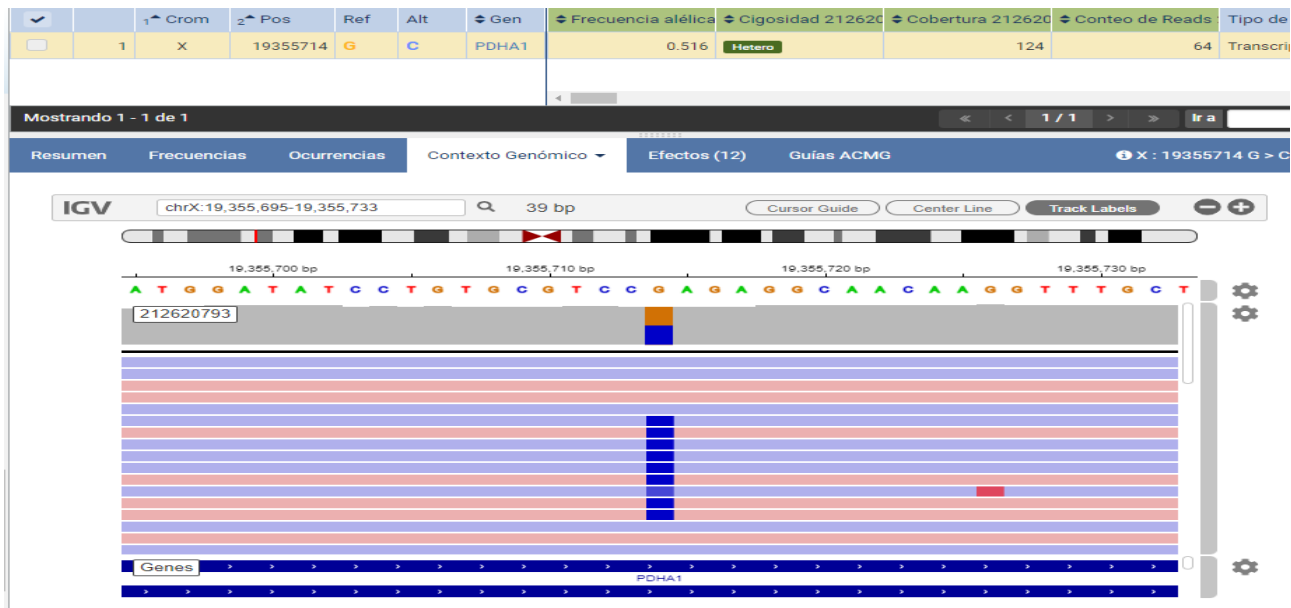
- a. Estudi de segregació en els progenitors d'una variant patogènica o probablement patogènica trobada per NGS en un fetus mitjançant un panell multigènic o en l'exoma clínic
- b. Estudi de segregació en una nova gestació d'una mutació/ns familiar/s que pot/den ser heretada/es pel fetus, en cas de malalties d'herència dominant, o recessives on els 2 progenitors són habitualment els portadors, o lligades al sexe on la mare és la portadora. En malalties dominants *de novo* el risc de recurrència és d'un 1% explicable per la presència d'un mosaic germinal en un dels progenitors.
- c. Confirmació d'una nova variant trobada per NGS en un fetus mitjançant un panell multigènic o en l'exoma clínic en cas de cobertura insuficient (< 30 reads) o en mutacions frameshift.

3-Panel multigènic: és una tècnica que determina simultàniament la seqüència de diversos gens mitjançant seqüenciació d'última generació (NGS) de tot l'exoma i interpretació dirigida als gens d'interès. Té l'avantatge de minimitzar els resultats incidentals. S'utilitza quan una malaltia o anomalia específica pot ser causada per variants patogèniques en un gran nombre de gens diferents coneguts. En el nostre medi utilitzem els següents panells, habitualment després de tenir un microarray normal i sense requerir-se sang dels 2 progenitors:

- a. Panel d'Hidrops-RASopaties en:
 - hidrops fetal després d'una QF-PCR normal i en paral·lel al microarray
 - translucència nugal ≥ 5 mm després d'una QF-PCR normal i en paral·lel al microarray
 - plec nugal persistent ≥ 5 mm (16-17 s.) o ≥ 6 mm (18-22 s.)
 - translucència nugal > 99 i estenosi pulmonar o cardiomiopatia
- b. Panel de CAKUT (congenital anomalies of the kidney and urinary tract): en ronyons hipercoegènics o displàsics/poliquístics quan es presentin de forma bilateral
- c. Panel d'Osteogènesi imperfecta: en ossos incorbats o fracturats
- d. Panel de Craniosinostosi: en sospita ecogràfica de craniosinostosi
- e. Panel d'Esclerosi tuberosa: en rabiomiomes cardíacs
- f. Panel dirigit pel fenotip fetal (codis HPO): és un mètode que alguns centres utilitzen abans d'ampliar-ho a exoma clínic.

El CI que han de signar els 2 progenitors es troba al final d'aquest protocol. En cas que es trobi una variant patogènica o probablement patogènica, s'haurà de segregar en els progenitors i es realitzarà una seqüenciació Sanger en els progenitors del gen involucrat per a comprovar si ha estat heretada o és *de novo*.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS



Detecció de la variant c.788G>C; p.Arg263Pro al gen PDHA1 (NM_000284.4) en heterozigosi tal i com es visualitza en l'eina de "Integrative Genome Viewer (IGV)"

4-Següenciació de l'exoma clínic (CES): és una tècnica que emprà NGS per determinar la seqüència de tots els exons codificants de tots els gens del genoma, amb interpretació posterior restringida als 4000 gens OMIM associats a un fenotip clínic. L'exoma representa només el 1-2% del genoma i conté prop del 85% de les variants conegudes com a causants de malalties. S'utilitza quan una malaltia o condició específica pot ser causada per variants patogèniques en molts gens desconeguts. En el nostre centre s'indica una seqüenciació de l'exoma clínic, després d'obtenir-se un microarray normal, en cas de:

- Gestació amb malformació fetal recurrent
- Fetus amb malformacions de 2 sistemes diferents
- CIR amb malformacions de 2 sistemes (excepte hipospàdies) o biometries (LF o PC) < -4DE sense signes d'insuficiència placentària
- Displàsia esquelètica. En cas de displàsia esquelètica letal, millor esperar a les dades de l'anatomia patològica i RX
- Anomalies complexes del SNC
- Cardiopatia o anomalia estructural amb hpoplàsia/absència dels solcs olfactoris (sospita CHARGE)

L'exoma es cursa havent-se realitzat una extracció de sang dels 2 progenitors per extreure'n l'ADN. En els casos en què es tracti d'una gestació en curs i que calgui la màxima rapidesa es realitzarà la seqüenciació de l'exoma en "trio", és a dir, se seqüenciaran els exomes del fetus, mare i pare simultàniament. En d'altres casos només se seqüenciarà el fetus i l'ADN parental s'utilitzarà per segregat les variants candidates. Idealment tots els resultats han de ser discutits per un Comitè de Revisió Clínica on es revisin la patogeneïtat de la variant, la concordança de totes les variants candidates amb el fenotip fetal i amb la segregació observada a la família. En casos negatius,

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

indicarà de quins gens relacionats amb el fenotip fetal s'haurà de revisar la cobertura. Aquests comitè idealment ha d'incloure un genetista molecular, un/dos genetistes clínics (prenatal i pediàtric), un patòleg perinatal i un assessor genètic.

Assessorament post interrupció legal de la gestació (ILE): En cas d'ILE en un fetus malformat sense un diagnòstic genètic previ (amb QF-PCR, cariotip o microarray normals) i sense tenir ADN guardat, és convenient l'obtenció d'una mostra fetal (LA, teixit, sang) abans de la interrupció que permeti la realització de futurs estudis moleculars en funció de l'orientació que aporti la necròpsia, o la radiografia en cas de displàsia esquelètica.

6. EPIGENÈTICA. ESTUDIS DE DISOMIA UNIPARENTAL I DE METILACIÓ

L'epigenètica estudia els canvis en l'expressió genètica produïts per un mecanisme diferent als canvis de seqüència de l'ADN. En el genoma humà hi ha més de 100 gens "imprintats", és a dir, que presenten una expressió monoal·lèlica (preferencial o exclusiva) d'una sola còpia del gen en funció del seu origen parental. Així doncs, hi ha malalties que apareixen per la silenciament d'una seqüència correcta d'ADN, habitualment per metilació de la citosina o bé per tenir les 2 còpies d'un gen imprintat que procedeixen del mateix progenitor (disomia uniparental, UPD).

1.- Els **estudis de metilació** en gens imprintats rellevants en el desenvolupament i diferenciació fetals es realitzen mitjançant la tècnica de MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex ligation-dependent probe amplification). Per sospita dels síndromes de Silver-Russell o de Beckwith-Wiedemann realitzarem estudis de metilació en cas de:

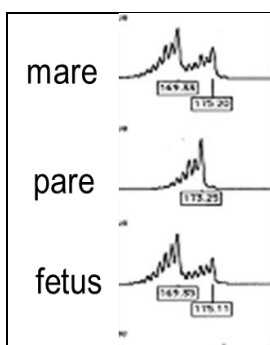
- a. CIR amb macrocefàlia relativa HC/AC > p90 o asimetria ossos llargs > 15%: es realitzarà MLPA de metilació 11p15 per sospita de Síndrome de Silver-Russell, ja que en un 30-50% dels casos està causada per una hipometilació del centre d'imprinting IC1 patern.
- b. Omfalocel aïllat o associat a organomegàlia, asimetria o macroglòsia: es realitzarà MLPA de metilació 11p15 ja que habitualment per sospita de síndrome de Beckwith-Wiedemann ja pot estar causada per una hipometilació del centre d'imprinting IC2 matern (40-50%) o una hipermetilació del IC1 matern (5-10%) o per tots 2 canvis alhora en una UPD paterna (20%), canvis localitzats en la regió 11p15.5.
- c. Omfalocel amb tòrax reduït o polihidramni: : MS-MLPA en 14q31-32 per sospita de síndrome Kagami-Ogata

2.- La **disomia uniparental** (UPD) es produeix quan els 2 cromosomes homòlegs d'un mateix parell provenen d'un mateix progenitor. Es pot classificar en **isodisomia** si tots dos cromosomes són idèntics i **heterodisomia** si corresponen als 2 al·lels d'un progenitor. La incidència de disomia uniparental de qualsevol cromosoma en nounats vius s'ha estimat en 1 / 3.500.

PROTOCOLO: ESTUDIS GENÈTICS EN MOTRES FETALS

La rellevància clínica de la disomia uniparental depèn principalment que el cromosoma implicat sigui un dels 6 cromosomes que presenten regions subjectes a imprinting (**cromosomes 6,7,11,14,15 i 20**). Per tant, estarà indicat l'estudi de heterodisomia amb mostres d'ADN dels 2 progenitors quan estiguin implicats qualsevol dels 6 cromosomes imprintats en:

- Trisomia confinades a placenta, pures o en mosaic. En les trisomies 15 confinades a placenta hi ha risc de Prader-Willi / Angelman
- Translocació robertsoniana amb implicació dels cromosomes 14 o 15
- Cromosoma marcador derivat dels cromosomes imprintats
- Sospita de síndrome de Silver-Russell: UPD7 materna en líquid amniòtic (10% casos) en cas d'estudis de metilació normals.



Estudi de microsatèl·lits del cromosoma 15 que mostren una disomia uniparental materna causant de la síndrome de Prader-Willi

Responsables del protocol:	BCNatal: Antoni Borrell i Joan Sabrià Genètica CDB: Celia Bádenas, Laia Rodríguez-Revenga, Anna Soler, Meritxell Jodar, Josep Oriola
Data del protocol i actualitzacions:	2017, 2018, 2019
Última actualització:	15/07/2021
Pròxima actualització:	15/07/2021
Codi Hospital Clínic:	MMF-15-2007
Codi Sant Joan de Deu:	

REALITZACIÓ DE PANELL DE GENS EN CAS DE MALFORMACIÓ FETAL

IDENTIFICACIÓ PROGENITOR

Nom i Cognoms

Edat

MARE		PARE	
------	--	------	--

Número història clínica

IDENTIFICACIÓ REPRESENTANT LEGAL (si és procedent)

Nom i Cognoms

Víncle amb el progenitor

Quan en una ecografia es detecta una malformació fetal s'ofereix un estudi genètic per comprovar si aquesta malformació forma part d'una síndrome genètica que pugui ocasionar discapacitat intel·lectual o dificultats en el desenvolupament psicomotor del nen/nena que no siguin els esperables per la malformació en si mateixa.

Amb l'objectiu de conèixer la causa de la malformació fetal que s'ha detectat, ara que ja tenim un resultat del microarray normals, se li ofereix l'anàlisi molecular mitjançant la tècnica de seqüenciació massiva (NGS, de l'anglès *next generation sequencing*) dels gens relacionals amb el motiu de l'estudi.

¿En què consisteix el panell de gens?

La seqüenciació del nostre ADN és una eina molt útil en el diagnòstic clínic, ja que permet, a partir de una mostra del nostre ADN, identificar mutacions en el nostre material genètic causant de patologia. La identificació d'una causa genètica de la malformació permetrà estimar millor les repercussions de la malaltia i el risc de que es repeteixi (recurrència) i així poder oferir un assessorament genètic personalitzat de cara a futures gestacions.

Fins fa poc, quan es sospitava d'un trastorn o malaltia d'origen genètic, s'analitzava de forma successiva, un a un, la seqüència d'ADN d'un o de diversos gens causants de la malaltia que es sospitava. Actualment la NGS permet determinar de forma simultània la seqüència d'ADN de diversos gens. Aquesta anàlisi dels gens relacionats amb la malaltia que es sospita es el que es coneix com a **panell de gens**. Això resulta particularment útil en aquelles malalties o trastorns genètics causats per múltiples i diferents gens.

El panell de gens es realitzarà a partir d'una mostra biològica del fetus (líquid amniòtic, vellositat corial, sang de cordó, o teixit fetal), que tingui prou quantitat i qualitat. Aquesta mostra s'enviarà al Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB) de l'Hospital Clínic de Barcelona (HCB) o en un altre laboratori designat per completar el procés diagnòstic on s'extraurà l'ADN per a la seqüenciació dels gens

Quin panell es realitzarà

	PANELL	NOMBRE DE GENS
	Panell d'hídrops-RASopaties	130
	Panell CAKUT	140
	Panell d'osteogènesi imperfecta	22
	Panell d'esclerosi tuberosa	2
	Panell de craniosinostosi	11
	Panell de miocardiopatia	119

Notificació de resultats.

Els resultats de les proves genètiques se li facilitaran a través del facultatiu que les va sol·licitar i li proporcionarà l'assessorament genètic corresponent.

La informació dels resultats és estrictament confidencial i únicament es facilitarà als dos progenitors.

L'HCB l'informa que tractarà les seves dades amb finalitats assistencials, i les cedirà únicament en aquells casos legalment exigibles, de conformitat amb l'exposat a l'article 9.2.h) del Reglament (UE) 2016/679. Pot exercir els seus drets a l'Oficina d'Atenció a la Ciutadania de l'HCB i obtenir-hi una còpia completa de la política de protecció de dades.

¿Quins resultats puc esperar?

Ha de tenir en compte que es poden trobar:

- a) **alteracions benignes (variants de la normalitat)**, que no tenen cap repercussió clínica, que no informarem.
- b) **variants de significat clínic incert (VUS)**, que son alteracions no descrites prèviament o de significat desconegut, que tampoc no informarem.

Donat que només s'analitzaran els gens que estan indicats en cada panell. No es trobaran variants patogèniques que no estan relacionades amb el motiu de consulta.

En el cas que s'identifiqui una o més alteracions genètiques que siguin possible causa de la condició que estem estudiant ens posarem en contacte amb vostè per discutir els resultats i les conseqüències. Per ajudar a interpretar els resultats i conèixer el tipus d'herència de la variant identificada, estudiarem si aquesta/es variants es heretada dels progenitors. En aquest cas se li demanaria una mostra de sang per analitzar la variant trobada en el seu fill/filla.

En signar aquest document vostè confirma que ha entès els següents punts:

- Únicament el personal sanitari autoritzat per l'HCB podrà accedir a les seves dades personals i als resultats de les proves genètiques.
- Pot caldre una nova mostra si la que s'ha rebut en el laboratori no reuneix les condicions necessàries per realitzar la seqüenciació de l'ADN amb èxit.
- Un resultat normal no descarta totalment que una persona no sigui portadora d'una alteració genètica, ja que podria estar localitzada en uns altres gens no analitzats. L'anàlisi genètica és una àrea d'evolució ràpida. Com que la interpretació està basada en la informació disponible en les bases de dades en el moment de la realització del test, aquesta podria canviar en el futur.
- L'anàlisi genètica pot proporcionar resultats que tinguin implicacions familiars.
- Les proves genètiques poden revelar que les relacions biològiques veritables no es corresponen amb les informades. Aquesta informació no serà reportada si no es veritablement necessària.
- Seguint les recomanacions europees, no es comunicaran els resultats incerts, ni els benignes

He estat informat/informada per l'equip mèdic que m'atén que el meu fill/filla o jo podríem estar afectats o ser portadors d'un trastorn genètic, i de la conveniència de ser sotmesos a proves genètiques diagnòstiques.

La informació m'ha estat facilitada de forma comprensible i les meves preguntes han estat contestades, per la qual cosa dono el meu consentiment per realitzar la següent prova genètica en el CDB o en d'altres laboratoris designats per completar el procés diagnòstic. Malgrat tot, podré revocar el meu consentiment en qualsevol moment si aquesta fos la meva voluntat. També podré contactar amb l'equip mèdic per a qualsevol dubte que tingui.

A....., a..... de..... de 20.....

Signatura del progenitor o representant
DNI _____

Signatura del facultatiu
Número d'empleat _____

Autoritzo que les meves mostres biològiques puguin ser conservades i utilitzades per a recerca, prèvia autorització del Comitè Ètic de Recerca de l'HCB. No obstant això, se'm sol·licitarà un consentiment específic per utilitzar les meves mostres en recerca o per emmagatzemar-les en una col·lecció i/o biobanc.

Signatura del progenitor o representant

L'HCB l'informa que tractarà les seves dades amb finalitats assistencials, i les cedirà únicament en aquells casos legalment exigibles, de conformitat amb l'exposat a l'article 9.2.h) del Reglament (UE) 2016/679. Pot exercir els seus drets a l'Oficina d'Atenció a la Ciutadania de l'HCB i obtenir-hi una còpia completa de la política de protecció de dades.

SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA CLÍNIC EN CAS DE MALFORMACIÓ FETAL

IDENTIFICACIÓ PROGENITOR

Nom i Cognoms

Edat

MARE		PARE	
------	--	------	--

Número història clínica

IDENTIFICACIÓ REPRESENTANT LEGAL (si és procedent)

Nom i Cognoms

Víncle amb el progenitor

Quan en una ecografia es detecta una malformació fetal s'ofereix un estudi genètic per comprovar si aquesta malformació forma part d'una síndrome genètica que pugui ocasionar discapacitat intel·lectual o dificultats en el desenvolupament psicomotor del nen/nena que no siguin els esperables per la malformació en si mateixa.

Amb l'objectiu de conèixer la causa de la malformació fetal se li ofereix l'anàlisi molecular mitjançant seqüenciació de l'exoma clínic (SEC), ja que el resultat del cariotip i el microarray són normals.

¿En què consisteix la seqüenciació d'exoma clínic?

La seqüenciació de l'exoma és una eina molt útil per al diagnòstic clínic, ja que permet, a partir de una mostra del nostre ADN, identificar mutacions en el nostre material genètic causant de patologia. La identificació d'una causa genètica de la malformació permetrà estimar millor les repercussions de la malaltia i el risc que es repeteixi (recurrència) i així poder oferir un assessorament genètic personalitzat de cara a futures gestacions.

El nostre material genètic conté uns 23.000 gens, que estan formats per introns i exons. L'exoma és la part del genoma formada pels exons, que és la part del nostre ADN encarregada de codificar les proteïnes i estructures essencials per l'organisme. Així doncs, amb l'estudi de l'exoma s'estudien moltes de les malalties o patologies causades per un únic gen.

La SEC es realitzarà a partir d'una mostra biològica del fetus (líquid amniòtic, vellositat corial, sang de cordó, o teixit fetal), que tingui prou quantitat i qualitat. Aquesta mostra s'enviarà al Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB) de l'Hospital Clínic de Barcelona (HCB) on s'extraurà l'ADN per a la seqüenciació de l'exoma.

Notificació de resultats

Els resultats de les proves genètiques se li facilitaran a través del facultatiu que les va sol·licitar i li proporcionarà l'assessorament genètic corresponent.

La informació dels resultats és estrictament confidencial i únicament es facilitarà als dos progenitors.

¿Quins resultats puc esperar?

Tot i que es seqüencia tot l'exoma s'analitzaran només els gens que estan descrits com a causants de patologia.

Ha de tenir en compte que es poden trobar:

- a) **alteracions benignes (variants de la normalitat)**, que no tenen cap repercussió clínica, que no informarem.
- b) **variants de significat clínic incert (VUS)**, que son alteracions no descrites prèviament o de significat desconegut, que tampoc informarem.
- c) **variants patogèniques** que no estan relacionades amb el motiu de consulta. Aquests es coneixen com a troballes incidentals, que vostè haurà de decidir si en vol ser informat.

L'HCB l'informa que tractarà les seves dades amb finalitats assistencials, i les cedirà únicament en aquells casos legalment exigibles, de conformitat amb l'exposat a l'article 9.2.h) del Reglament (UE) 2016/679. Pot exercir els seus drets a l'Oficina d'Atenció a la Ciutadania de l'HCB i obtenir-hi una còpia completa de la política de protecció de dades.

En el cas que s'identifiqui una o més alteracions genètiques que siguin possible causa de la condició que estem estudiant ens posarem en contacte amb vostè per discutir els resultats i les conseqüències.

Molt sovint per ajudar a interpretar els resultats i conèixer el tipus d'herència de la variant identificada, es sol estudiar aquesta/aquestes variants en els progenitors. Es per aquest motiu que se li demana una mostra de sang que s'emmagatzema i només s'utilitza per a l'estudi de la variant trobada en el seu fill/filla. En cap cas se li fa l'estudi complet.

En signar aquest document vostè confirma que ha entès els següents punts:

- Únicament el personal sanitari autoritzat per l'HCB podrà accedir a les seves dades personals i als resultats de les proves genètiques.
- Pot caldre una nova mostra si la que s'ha rebut en el laboratori no reuneix les condicions necessàries per realitzar la SEC amb èxit.
- Un resultat normal no descarta totalment que una persona no sigui portadora d'una alteració genètica, ja que podria estar localitzada en uns altres gens no analitzats. L'anàlisi genètica és una àrea d'evolució ràpida. Com que la interpretació està basada en la informació disponible en les bases de dades en el moment de la realització del test, aquesta podria canviar en el futur.
- La SEC pot proporcionar resultats que tinguin implicacions familiars.
- Les proves genètiques poden revelar que les relacions biològiques veritables no es corresponen amb les informades. Aquesta informació no serà reportada si no es veritablement necessària.
- Seguint les recomanacions europees, no es comunicaran els resultats incerts, ni els benignes
- Per si es donés el cas, hauran de decidir si volen o no ser informats de les troballes incidentals:

Sí, desitjo ser informat No, no desitjo ser informat

He estat informat/informada per l'equip mèdic que m'atén que el meu fill/filla o jo podríem estar afectats o ser portadors d'un trastorn genètic, i de la conveniència de ser sotmesos a proves genètiques diagnòstiques.

La informació m'ha estat facilitada de forma comprensible i les meves preguntes han estat contestades, per la qual cosa dono el meu consentiment per realitzar la següent prova genètica en el CDB o en d'altres laboratoris designats per completar el procés diagnòstic. Malgrat tot, podré revocar el meu consentiment en qualsevol moment si aquesta fos la meua voluntat. També podré contactar amb l'equip mèdic per a qualsevol dubte que tingui.

A....., a..... de..... de 20....

Signatura del progenitor o representant
DNI _____

Signatura del facultatiu
Número d'empleat _____

Autoritzo que les meves mostres biològiques puguin ser conservades i utilitzades per a recerca, prèvia autorització del Comitè Ètic de Recerca de l'HCB. No obstant això, se'm sol·licitarà un consentiment específic per utilitzar les meves mostres en recerca o per emmagatzemar-les en una col·lecció i/o biobanc.

Signatura del progenitor o representant

L'HCB l'informa que tractarà les seves dades amb finalitats assistencials, i les cedirà únicament en aquells casos legalment exigibles, de conformitat amb l'exposat a l'article 9.2.h) del Reglament (UE) 2016/679. Pot exercir els seus drets a l'Oficina d'Atenció a la Ciutadania de l'HCB i obtenir-hi una còpia completa de la política de protecció de dades.