

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php

Recomanació

Recomanacions per a l'aplicació clínica de procediments basats en la matriu genòmica en el diagnòstic prenatal d'aneuploidies

Secció d'Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia, Secció de Medicina Materno-Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia, Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya, Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia de la Societat Catalana de Pediatria, Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya

Miquel del Campo Casanelles ^a, Alberto Plaja Rustein ^b, Elena Casals Font ^c, Francesc Figueres Retuerta ^d, Rosana de la Chica Díaz ^e, Lluís Armengol Dulcet ^f, Vincenzo Cirigliano ^g, Antoni Borrell Vilaseca ^h

^a Membre del Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia de la Societat Catalana de Pediatria

^b Membre de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya

^c Coordinadora del Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya

^d Secretari de la Secció de Medicina Materno-fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia

^e Coordinadora de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya

^f Assessor (Q-Genomics)

^g Assessor (Labco Diagnostics)

^h President de la Secció d'Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia

2015 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

La micromatriu genòmica, també anomenada micromatriu cromosòmica, cariotip molecular o bé simplement matriu (array en anglès), és un procediment genètic, basat en una hibridació sobre una matriu de sondes d'ADN, que permet estudiar diversos loci distribuïts al llarg del genoma i conèixer les possibles pèrdues (deleccions) o guanys (duplicacions) en el material genètic d'un individu. Presenta una resolució entre 10 i 1000 vegades superior a la del cariotip convencional i un temps de d'espera dels resultats més curt, ja que habitualment no requereix realitzar un cultiu cel·lular. Tot i que permet detectar deleccions i duplicacions en el material genètic, anomenades variants del nombre de còpies (CNV, acrònim de l'anglès *copy number variations*), no detecta ni les reorganitzacions equilibrades (a diferència del cariotip), ni les alteracions de seqüència o mutacions (igual que el cariotip).

En funció de la seva rellevància clínica, les CNV es classifiquen en tres tipus: benignes, patogèniques o incertes (VOUS o VUS, acrònims de l'anglès *variants of unknown significance*). Es considera que una variant del nombre de còpia és una VOUS quan no hi ha prou evidència en la literatura (o en

les bases de dades) ni de la seva presència en població general sana, ni de la seva associació amb fenotips anòmals. El fet que algunes variants tinguin una penetrància incompleta fa més difícil demostrar la seva patogenicitat.

En el diagnòstic prenatal d'aneuploidies, s'ha demostrat que els procediments basats en micromatrius presenten una capacitat de detecció d'anomalies superior a la del cariotip convencional, per a qualsevol de les indicacions en les que s'ha de realitzar un procediment invasiu. En cas de malformacions fetals, detecta un 6 % d'anomalies addicionals al cariotip i en d'altres indicacions, o en absència d'indicació, entre un 1-1,5 % (1-5). Aquestes troballes suplementàries de la micromatriu estan relacionades amb la detecció de síndromes de microdelecció o microduplicació i no són detectables amb el cariotip. Hi ha síndromes clàssiques, com la microdelecció 22q11 o síndrome de diGeorge/velocardiofacial, la microdelecció 7q11.23 o síndrome de Williams, i n'hi ha de descrites més recentment com són les microdeleccions i microduplicacions 1q21.1, 16p11.2, etc... En pediatria, la micromatriu ha esdevingut des del 2010 el procediment genètic de primera línia en l'estudi de la discapacitat intel·lectual, les malformacions majors o menors i

<http://www.acclc.cat/continguts/ivv183.pdf>

2015 © ACCLC. Tots els drets reservats.

del trastorn de l'espectre autista (6). En el diagnòstic prenatal hi ha qui també suggereix la substitució del cariotip per la micromatriu i qui no descarta la seva oferta universal a les gestants (2).

2. Procediments

2.1. Tipus de micromatrius i sondes

En l'actualitat, existeixen dos tipus de micromatrius:

- **Matriu de CGH.** Es basa en la realització d'una hibridació genòmica competitiva (CGH, acrònim de l'anglès *comparative genetic hybridization*) entre un ADN fetal i un ADN "control", en una matriu de sondes d'ADN. Les sondes poden presentar un elevat nombre de nucleòtids (BACs, acrònim de l'anglès *bacterial artificial chromosome*) o bé un nombre reduït de nucleòtids (oligonucleòtids).
- **Matriu d'SNP.** Es compara el grau d'hibridació entre un ADN fetal i un ADN "control" prèviament determinat, en una matriu d'SNPs (acrònim de l'anglès *single nucleotide polymorphisms*).

2.2. Tipus de disseny de matrius

Existeixen tres dissenys diferenciats de micromatrius en funció de quina sigui la disposició de les sondes d'ADN:

- **Micromatrius dirigits (*targeted*).** Totes les sondes estan dirigits a regions causants de trastorns coneguts.
- **Micromatrius de genoma complet (*WGA*, acrònim de l'anglès *whole genome array*).** Presenten una distribució uniforme de les sondes d'ADN en totes les regions.
- **Micromatrius mixtes.** Combinen sondes distribuïdes al llarg de tot el genoma amb una separació uniforme (en anglès *backbone coverage*) i amb una major densitat de sondes en les regions causants de trastorns coneguts. Són les micromatrius més utilitzades en el diagnòstic prenatal.

2.3. Resolució i filtratge

La resolució de les micromatrius depèn del nombre de sondes, de la seva mida i sobretot de la seva separació. En el diagnòstic prenatal es recomana una resolució mitjana no inferior a (0,5-1,0) Mb (7, 8). Les matrius de CGH d'oligonucleòtids ofereixen una resolució més alta que no pas les de BACs, però són més exigents pel que fa a qualitat i quantitat de l'ADN de la mostra. La dificultat de l'extracció d'ADN a partir de líquid amniòtic no cultivat ha propiciat la difusió de les micromatrius de BACs, amb una resolució mitjana mínima d'1 Mb. De tota manera, aquest tipus de micromatrius estan sent progressivament substituïdes per les micromatrius d'oligonucleòtids, amb una resolució mitjana mínima 0,5 Mb (7).

En el diagnòstic prenatal es prefereix que les micromatrius no siguin de molt alta resolució per tal de minimitzar la detecció de VOUS. Una altra via d'obviar aquest problema és la utilització de micromatrius d'alta resolució i filtrar posteriorment els resultats, seleccionant només les CNV patogèniques i les que presenten una mida més gran.

2.4. Mostres

Qualsevol mostra fetal amb prou contingut d'ADN és vàlida per dur a terme un procediment basat en micromatrius, com ara les procedents de les vellositats corials, el líquid amniòtic, la sang o un altre fluid o teixit fetal. En paral·lel a l'extracció de l'ADN, és recomanable establir un cultiu cel·lular de rescat, que pot ser útil per extreure més ADN, realitzar un cariotip o per d'altres estudis de confirmació diagnòstica ulteriors. Per aquest motiu, s'aconsella una extracció de 15-20 cm³ de líquid amniòtic o 20-40 mg de vellositat corial.

Si no s'empren matrius de SNP, és convenient realitzar un estudi basat en la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa fluorescent (QF-PCR, acrònim de l'anglès *quantitative fluorescence polymerase chain reaction*) prèvi per descartar la contaminació materna de les mostres, determinar el sexe fetal (per seleccionar el sexe de l'ADN "control") i diagnosticar les aneuploidies més freqüents i les triploidies.

En cas d'una interrupció legal de la gestació (ILE, acrònim del castellà *Interrupción legal del embarazo*), cal assegurar la presa d'una mostra fetal (líquid amniòtic, teixit o sang) per futurs estudis d'ADN fetal i per poder disposar de cèl·lules fixades o extensions aptes per un estudi basat en la hibridació *in situ* fluorescent (FISH, acrònim de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*). En cas que la decisió de la ILE no depengui del resultat del procediment amb micromatriu, és factible diferir l'estudi fins després de la necròpsia, ja que pot aportar dades que indiquin que un altre estudi és més adient.

En cas de pèrdua gestacional, tant en avortaments espontanis com en morts avantpart, les micromatrius presenten l'avantatge de no requerir el cultiu cel·lular i, en conseqüència, minimitzar el risc de fracàs tècnic

3. Indicacions de les micromatrius

Són indicacions ben establertes de les micromatrius:

1. La identificació d'un defecte congènit major o de troballes ecogràfiques suggerents de defectes congènits menors (9). Per qualsevol malformació, la probabilitat d'una troballa relacionada amb el fenotip és un (6-9) % (1) superior en el procediment amb micromatriu que en el cariotip. En cas de cardiopatia, aquest percentatge augmenta fins al 12 % (10).
2. La restricció del creixement intrauterí (RCIU/CIR) precoç (<24 setmanes) i sever (<percentil 3).
3. La translucència nucal augmentada (> 3,5 mm o percentil 99). Presenta una probabilitat d'un 5 % de troballes addicionals al cariotip (11).
4. La presència d'una deleció o duplicació familiar críptica (no detectable pel cariotip), amb risc de transmissió i penetrància significatives, així com de prou rellevància clínica per donar opció a la ILE.
5. La troballa d'una translocació o inversió *de novo* aparentment equilibrada o d'un cromosoma marcador (especialment del tipus anell i marcador no satel·litzat) en el cariotip fetal, ja que no són fàcilment identificables per altres procediments.
6. La mort fetal intrauterina i l'avortament de segon trimestre, ja que la micromatriu té més èxit que el cultiu i major capacitat de detecció que el cariotip.
7. L'antecedent familiar de reordenament cromosòmic (translocació parental recíproca o inversió pericèntrica) en equilibri, per detectar segregacions desequilibrades potencialment no visibles pel cariotip.

Altres motius són:

8. La deleció o duplicació críptica (no detectable pel cariotip i, per tant, detectada per FISH / micromatriu) *de novo* en un descendent previ. Encara que no estigui demostrat un increment en el risc de recurrència, sempre existeix la possibilitat d'un mosaic germinal en un dels progenitors. Es podria recórrer també al FISH o a l'amplificació de sonda dependent de lligació multiplex (MLPA, acrònim de l'anglès *multiplex ligation-dependent probe amplification*) dirigits.
9. Per a qualsevol de les indicacions en les que s'ha de realitzar un procediment invasiu (i, sobretot, quan existeix un risc baix d'aneuploidia) per assegurar la major capacitat de detecció possible.

4. Resultats a informar

4.1. Els informes amb els resultats obtinguts a partir de procediments amb micromatrius han d'incloure sempre:

- Les especificacions de la micromatriu utilitzada (tipus de micromatriu, tipus i distribució de les sondes i la resolució mitjana aconseguida en les regions estudiades).
- Els criteris d'inclusió o exclusió dels diferents tipus de CNV (filtratge).
- Les limitacions del procediment, que són la impossibilitat de detectar reordenaments equilibrats, les triploïdies XXX (no detectables per les matrius de CGH, però sí per les matrius d'SNP), mosaïcismes baixos (<20 %) i mosaics que resultin en una dosi genòmica compensada (mosaic 45, X / 47, XXX).

4.2. En cas de **CNV patogènica** o probablement patogènica, en l'informe ha de constar-hi:

- La descripció detallada de les conseqüències fenotípiques descrites i citar les referències bibliogràfiques i les bases de dades consultades.
- El percentatge de penetrància coneguda i la variabilitat i la gravetat dels fenotips associats en les de penetrància incompleta.
- La indicació d'estudis familiars o d'altres estudis de confirmació basats, per exemple, en procediments com el cariotip, el MLPA, el FISH i la micromatriu, entre altres.
- Les CNV patogèniques de penetrància incompleta, predictives, d'estat de portador sa o presimptomàtiques només han de ser incloses quan tinguin prou penetrància i gravetat perquè puguin justificar una ILE o quan la seva informació hagi estat sol·licitada en el consentiment informat previ.

4.3. Les **CNVs de significat incert o VOUS** (que d'entrada no siguin probablement patogèniques) només s'han d'incloure a l'informe quan l'estudi de la segregació familiar pugui facilitar el reconeixement del seu caràcter probablement patogènic. La decisió d'estudiar una VOUS en els progenitors durant l'embaràs es basarà en els següents criteris de probable patogenicitat: mida, contingut genètic, funcions conegudes o previsibles d'aquests gens i concordança amb el fenotip observat.

4.4. No cal incloure les **CNVs benignes** en els informes.

5. Assessorament genètic

Com en qualsevol estudi genètic, és imprescindible dur a terme un assessorament genètic previ i posterior a la realització d'un procediment basat en micromatrius. L'assessorament ha de ser ofert per part de l'assessor genètic, el genetista clínic o l'obstetra, d'una manera no directiva.

5.1. Assessorament previ

Cal comentar els següents punts:

- Tant la micromatriu com el cariotip són incapaços de detectar mutacions puntuals de l'ADN.
- La micromatriu té una major capacitat de detecció que el cariotip, però no detecta alteracions equilibrades, triploïdies XXX (matrius de CGH) o mosaïcismes de baix grau o compensats.
- Només les CNVs patogèniques (o probablement patogèniques) amb prou repercussió per a la salut actual o futura del fetus han de ser considerades en una decisió de la ILE.

- Es poden detectar malalties de gravetat molt variable i difícil de predir.
- Hi ha CNVs patogèniques de susceptibilitat o amb penetrància incompleta, que impliquen només un risc d'afectació.
- Es poden identificar CNVs que causin malalties de presentació tardana i si són heretades d'un dels progenitors, poden aparèixer abans en el progenitor.
- Es poden detectar estats de portador sa per algunes malalties. En general, no s'informen prenatalment, però, idealment, s'hauria d'articular un mecanisme per informar a l'individu quan arribi a l'edat reproductiva.
- Com a norma general, les CNVs de significat incert (VOUS) que no siguin probablement patogèniques, no haurien de ser informades en l'etapa prenatal.
- L'ús de micromatrius pot identificar que les relacions biològiques reals no coincideixin amb les reportades per la parella (falses paternitats o incestos) i informar sobre graus de consanguinitat elevats

5.2. Assessorament posterior

Cal comentar les diverses troballes:

- En les CNVs patogèniques (o VOUS probablement patogèniques) s'hauran d'abordar els conceptes de penetrància i variabilitat en l'expressió.
- En les CNVs patogèniques (i VOUS amb alguna sospita de patogenicitat) que requereixin estudis familiars per a la seva millor classificació, s'hauran d'obtenir mostres parentals si no s'han extret prèviament.
- S'han de comentar els possibles tractaments i mesures de prevenció destinades a modificar el pronòstic a llarg termini, en cas que existeixin.

5.3. Assessorament posterior al ILE o al naixement

L'assessorament que es realitza posterior al ILE o posterior al naixement del fetus és el moment més adequat per a completar el diagnòstic multidisciplinari i comentar els riscos futurs i les opcions reproductives disponibles en una reflexió conjunta amb la parella.

5.4. Consentiments

Es recomana que hi hagi un consentiment específic dels estudis genètics addicionals al consentiment de la realització d'un procediment invasiu. Molts dels punts que formen part de l'assessorament genètic previ hauran de ser inclosos en el document d'informació i obtenir-ne el consentiment informat escrit.

Bibliografia

- (1) Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, *et al.* Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 2012;367(23):2175-84.
- (2) Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, *et al.* Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet* 2012;131(3):513-33.
- (3) Maya I, Davidov B, Gershovitz L, Zalstein Y, Taub E, Coppinger J, *et al.* Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenat Diagn* 2010;30(12-13):1131-7.
- (4) Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, *et al.* Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 2009;29(1):29-39.

- (5) Sahoo T, Cheung SW, Ward P, Darilek S, Patel A, del Gaudio D, *et al.* Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 2006;8(11):719–27.
- (6) Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86:749–64.
- (7) Vanakker O, Vilain C, Janssens K, Van der Aa N, Smits G, Bandelier C, *et al.* Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: the Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet* 2014;57(4):151–6.
- (8) Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, *et al.* The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Hum Mutat* 2012;33(6):923–9.
- (9) American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2013; 122(6):1374–7.
- (10) Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, *et al.* Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(1):27–35.
- (11) Grande M, Jansen F, Blumenfeld Y, Fisher A, Odibo A, Haak M, *et al.* Genomic Microarray in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype - A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25900824>> (Accés 2015-04-30) DOI: 10.1002/uog.14880.