

RECOMANACIONS PER A L'ÚS CLÍNIC DEL MICROARRAY GENÒMIC EN DIAGNÒSTIC PRENATAL.

Comitè Conjunt de la 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, i Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya

1. INTRODUCCIÓ

El “microarray genòmic”, també anomenat “microarray cromosòmic”, “cariotip molecular” o bé simplement “array”, és un mètode d'anàlisi genètica basat en una hibridació sobre una matriu de sondes d'ADN que interroguen diversos *loci* distribuïts al llarg del genoma. Té una resolució entre 10 i 1000 vegades superior a la del cariotip convencional i un temps de resposta més curt, ja que habitualment no requereix cultiu cel·lular. Detecta pèrdues i guanys de material genètic, anomenades “variants del nombre de còpies” (CNV: *copy number variations*), però 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 3 tipus: benignes, patogèniques o incertes (*VOUS* o *VUS: 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 Diagnòstic Prenatal, el microarray ha demostrat una capacitat de detecció d'anomalies superior a la del cariotip convencional, en qualsevol de les indicacions de prova invasiva. En cas de malformacions fetals, detecta un 6% d'anomalies addicionals al cariotip i en d'altres indicacions, o en absència d'indicació, entre 1-1.5% addicional¹⁻⁵. Aquestes troballes suplementàries del microarray són causants de síndromes de microdeleció o microduplicació i no són detectables amb el cariotip. Hi ha síndromes clàssiques, com la microdeleció 22q11 o síndrome de diGeorge/velocardiofacial, la microdeleció 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, el microarray ha esdevingut des del 2010 la tècnica d'anàlisi genètica de primera línia en l'estudi de la discapacitat intel·lectual, les malformacions majors o menors i del trastorn de l'espectre autista⁶. En Diagnòstic Prenatal hi ha qui també suggereix la substitució del cariotip pel microarray i qui no descarta la seva oferta universal a les gestants².

2. METODOLOGIA

2.1 Tipus de microarray i sondes.

Hi ha dues tecnologies de microarrays:

- **Array-CGH:** es realitza una hibridació genòmica competitiva (CGH) entre un ADN fetal i un ADN control, en una matriu de sondes d'ADN. Les sondes poden ser de grans dimensions : BACs (*bacterial artificial chromosomes*) o de mida més petita (oligonucleòtids).
- **SNP-array:** comparen la intensitat d'hibridació de l'ADN fetal amb un senyal control prèviament determinat, en una matriu d'SNPs (*single nucleotid polymorphisms*).

2.2 Tipus de disseny d'array

Hi ha 3 dissenys diferenciats de microarray en funció de la disposició de les sondes d'ADN:

- **Microarrays dirigits (*targeted*):** totes les sondes estan dirigides a regions causants de trastorns coneguts.
- **Microarrays de genoma complet (*WGA: Whole Genome Array*):** tenen una distribució uniforme de les sondes d'ADN en totes les regions.
- **Microarrays mixtos:** combinen sondes distribuïdes al llarg de tot el genoma amb una separació uniforme (*backbone coverage*), amb una major densitat de sondes en les regions causants de trastorns coneguts. Són els microarrays més utilitzats en Diagnòstic Prenatal.

2.3 Resolució i filtratge

La resolució dels microarrays depèn del nombre de sondes, la seva mida i sobretot de la seva separació. En Diagnòstic Prenatal es recomana una resolució mitjana no inferior a 0.5Mb-1Mb^{7,8}. Els arrays-CGH d'oligonucleòtids ofereixen una resolució més alta que no pas els 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 dels microarrays de BACs, amb una resolució mitjana mínima 1 Mb. De tota manera, aquest tipus de microarrays estan sent progressivament substituïts pels microarrays d'oligonucleòtids, amb una resolució mitjana mínima 0,5 Mb.⁷

En Diagnòstic Prenatal es prefereix que els microarrays no siguin de molt alta resolució per tal de minimitzar la detecció de VOUS. Una altra via d'obviar aquest problema és utilitzar un microarray d'alta resolució i filtrar posteriorment els resultats, seleccionant només les CNV patogèniques i les de mida més gran.

2.4. Mostres

Qualsevol mostra fetal amb prou contingut d'ADN és vàlida pel microarray, com ara 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 d'establir un cultiu cel·lular de rescat, que pot ser útil per extreure més ADN, realitzar un cariotip o per d'altres tècniques de confirmació diagnòstica ulteriors. Per aquest motiu, s'aconsella l'extracció de 15-20 cc de líquid amniòtic o 20-40 mg. de vellositat corial.

Si no s'empren SNP-arrays, és convenient realitzar una QF-PCR (*Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction*) prèvia per descartar la contaminació materna de les mostres, determinar el sexe fetal (per seleccionar el sexe de l'ADN control) i diagnosticar les aneuploïdies més freqüents i les triploïdies.

En cas d'una interrupció legal de la gestació (ILE), cal assegurar la presa d'una mostra fetal (líquid amniòtic, teixit o sang) per futurs estudis en ADN fetal i poder disposar de cèl·lules fixades o extensions aptes per FISH (*Fluorescent in situ hybridization*). En cas que la decisió d'ILE no depengui del resultat del microarray, és factible diferir la prova fins després de l'estudi de la necròpsia, ja que pot aportar dades que indiquin que una altra prova és més adient.

En cas de pèrdua gestacional, tant en avortaments espontanis com en morts avantpart, els microarrays presenten l'avantatge de no requerir cultiu cel·lular i d'aquesta manera es minimitza el risc de fracàs tècnic.

3. INDICACIONS DE MICROARRAY

Són indicacions ben establertes de microarray:

1. Identificació d'un defecte congènit major o de troballes ecogràfiques suggerents de defectes congènits menors⁹. En cas de qualsevol malformació la probabilitat d'una troballa relacionada amb el fenotip és d'entre un 6 i un 9%¹ superior en el microarray que en el cariotip. En cas de cardiopatia aquest percentatge augmenta fins al 12%¹⁰.

2. Restricció del creixement intrauterí (RCIU/CIR) precoç (<24 setmanes) i sever (<percentil 3).

3. Translucència nucal augmentada (> 3.5 mm o percentil 99). Presenta una probabilitat d'un 5% de troballes addicionals al cariotip¹¹.

4. 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 ILE.

5. 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 tècniques.

6. Mort fetal intrauterina i avortament de segon trimestre, ja que el microarray té més èxit que el cultiu i major capacitat de detecció que el cariotip.

7. Antecedent familiar de reordenament cromosòmic (translocació parental recíproca o inversió pericèntrica) en equilibri, per detectar segregacions desequilibrades potencialment no visibles pel cariotip.

Altres motius:

8. Deleció o duplicació críptica (no detectable per cariotip i per tant detectada per FISH / microarray) “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 MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) dirigits.

9. En qualsevol indicació de tècnica invasiva (i sobretot en risc baix d’aneuploidia) per assegurar la major capacitat de detecció possible.

4.-RESULTATS A INFORMAR

4.1 El **contingut dels informes** dels microarrays ha d’incloure sempre:

- Les especificacions tècniques del microarray utilitzat (tipus de microarray, tipus i distribució de les sondes i resolució mitjana aconseguida en les regions interrogades).
- Els criteris d’inclusió o exclusió dels diferents tipus de CNV (filtratge).
- Les limitacions de la tècnica, que són la impossibilitat de detectar reordenaments equilibrats, les triploïdies XXX (no detectables pels arrays-CGH, però sí pels SNP-arrays), 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:

- Descripció detallada de les conseqüències fenotípiques descrites i citar les referències bibliogràfiques i bases de dades consultades
- Percentatge de penetrància coneguda i la variabilitat i gravetat dels fenotips associats en les de penetrància incompleta
- La indicació d’estudis familiars o de proves de confirmació (cariotip, MLPA, FISH, microarray ...)

- 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 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 gènic, funcions conegudes o previsible 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 prova genètica, és imprescindible l'acte d'assessorament genètic previ i posterior a la realització del microarray. 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 pre-test: Cal comentar els següents punts:

- Tant el microarray com el cariotip són incapaços de detectar mutacions puntuals del ADN.
- El microarray té més capacitat de detecció que el cariotip, però no detecta alteracions equilibrades, triploidies XXX (arrays-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 d'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 seran informades en l'etapa prenatal.

- L'ús de microarrays 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 post-test: 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 de prendre mostres parentals si no s'han pres 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 post-ILE / naixement:

L'assessorament que es realitza post-ILE o post-naixement del fetus és el moment més adequat per a completar el diagnòstic multidisciplinari, 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 de les proves genètiques addicional al consentiment de la prova invasiva. Molts dels punts que formen part de l'assessorament genètic pre-test hauran de ser inclosos en el document d'informació i obtenir-ne consentiment escrit.

BIBLIOGRAFIA

- 1.Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2175-84.
- 2.Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragonés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Ángeles Mori M, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA.. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet* 2012 Mar;131(3):513-233.
3. Maya I, Davidov B, Gershovitz L, Zalstein Y, Taub E, Coppinger J, Shaffer LG, Shohat M. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenat Diagn* 2010; 30(12-13):1131-1137
- 4.Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet 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, Kang SH, Lalani SR, Li J, McAdoo S, Burke A, Shaw CA, Stankiewicz P, Chinault AC, Van den Veyver IB, Roa BB, Beaudet AL, Eng CM. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 2006; 8(11):719–727
6. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, 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, 86:749-764
7. Vanakker O, Vilain C, Janssens K, Van der Aa N, Smits G, Bandelier C, Blaumeiser B, Bulk S, Caberg JH, De Leener A, De Rademaeker M, de Ravel T, Desir J, Destree A, Dheedene A, Gaillez S, Grisart B, Hellin AC, Janssens S, Keymolen K, Menten B, Pichon B, Ravoet M, Revencu N, Rombout S, Staessens C, Van Den Bogaert A, Van Den Bogaert K, Vermeesch JR, Kooy F, Sznajer Y, Devriendt K. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: the Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet.* 2014 Mar;57(4):151-6
8. Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, Sikkema-Raddatz B, Ledbetter DH, Zuffardi O, van Ravenswaaij-Arts CM. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Hum Mutat.* 2012 Jun;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; Dec;122(6):1374-7
10. Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, Haak MC. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):27-35.
11. Grande M, Jansen F, Blumenfeld Y, Fisher A, Odibo A, Haak M and Borrell A. Genomic Microarray in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype - A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; online

MEMBRES DEL COMITÈ CONJUNT

Miguel del Campo: *Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia de la Societat Catalana de Pediatria*

Alberto Plaja: *Membre de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya*

Elena Casals: *Coordinadora del Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya*

Francesc Figueres: *Secretari de la Secció de Medicina Materno-fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia*

Rosa Ana de la Chica: *Coordinadora de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya*

Lluís Armengol: *Assessor (Q-Genomics)*

Vincenzo Cirigliano: *Assessor (Labco Diagnostics)*

Antoni Borrell: *President de la Secció Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia*

Aprovat Abril 2015