



Curso

Biología molecular aplicada al diagnóstico médico

2021

Clase 5: Diagnóstico molecular en medicina reproductiva

Círculo Médico de Rosario | Fecha: 23/11/2021



Lic. Guadalupe Méjico

Responsable Plataforma Genética Médica

guadalupe.mejico@heritas.com.ar

Dra. Ivana Canonero

Asesora Genética Plataforma Genética Médica

ivana.canonero@heritas.com.ar

Programa



- **Etapas diagnósticas en medicina reproductiva:**

- ✓ Preconcepcional
- ✓ Preimplantacional
- ✓ Prenatal
- ✓ Postnatal

- **Casos clínicos**

- ✓ Prenatal
- ✓ Postnatal

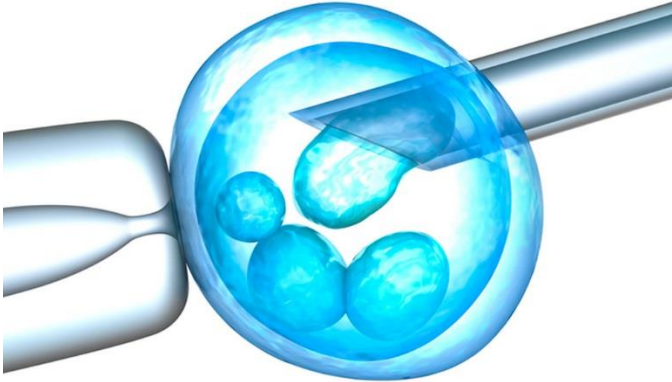


ETAPAS DIAGNÓSTICAS EN LA MEDICINA REPRODUCTIVA



PRECONCEPCIONAL

PREIMPLANTACIONAL



PRENATAL

POSTNATAL



PRECONCEPCIONAL

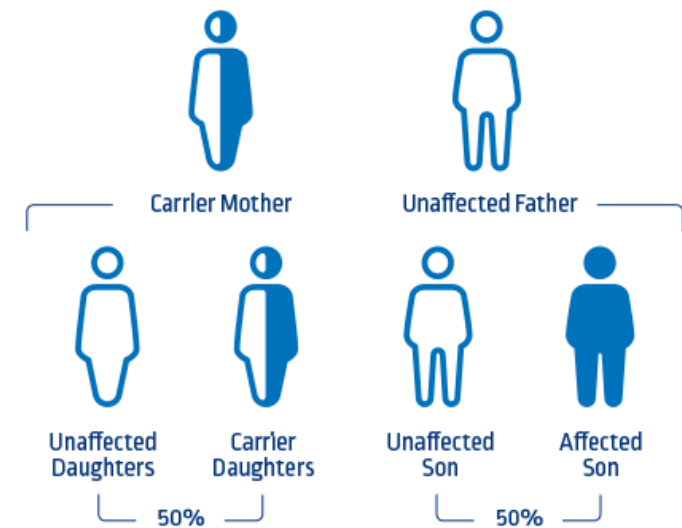


Objetivo

Brindar información a los progenitores de la posibilidad de transmisión de enfermedades hereditarias, para minimizar así su transmisión a la descendencia en las siguientes generaciones. Definir el riesgo de la pareja y asesorarlos.

¿A quién está dirigido?

- A cualquier persona o pareja en edad reproductiva con intenciones de tener un hijo/a
- Ante un TRA con óvulos o espermatozoides de donantes
- Parejas con consanguinidad
- Parejas de grupos étnicos cerrados
- Pareja con antecedentes familiares o personales



Test de portadores o CGT (Carrier Genetic Test)



Objetivo: detectar la presencia de enfermedades monogénicas hereditarias. Se utiliza para detectar enfermedades de herencia recesivas y ligadas al X.



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS

COMMITTEE OPINION

Number 691 • March 2017
(Reaffirmed 2020)

(Replaces Committee Opinion Number 318, October 2005;
Committee Opinion Number 432, May 2009;
Committee Opinion Number 442, October 2009;
Committee Opinion Number 469, October 2010;
Committee Opinion Number 486, April 2011)

Committee on Genetics

This Committee Opinion was developed by the American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Genetics in collaboration with committee members Britton Rink, MD; Stephanie Romero, MD; Joseph R. Biggio Jr, MD; Devereux N. Saller Jr, MD; and Rose Giardine, MS.

This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

Genetics
in**Medicine**

ACMG POLICY STATEMENT

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG position statement on prenatal/preconception expanded carrier screening

Wayne W. Grody, MD, PhD^{1,2}, Barry H. Thompson, MD, MS³, Anthony R. Gregg, MD⁴, Lora H. Bean, PhD⁵, Kristin G. Monaghan, PhD⁶, Adele Schneider, MD⁷ and Roger V. Lebo, PhD⁸

Carrier Screening for Genetic Conditions

	CGT Bank	CGT Plus	CGT Exome
Metodología	Secuenciación Completa del Exoma (WES)		
Características	Panel exclusivo para Donantes	Panel Extendido	Panel Extendido Premium
Genes	H: 7 genes AR M: 71 genes (incluye 64 ligados a X)	H: 455 genes AR M: 519 genes (incluye 64 ligados a X)	H: 1.979 genes AR M: 2.043 genes (incluye 64 ligados a X)
Variantes	~3.800	~20.000	>50.000
Número de enfermedades	Hasta 75	Hasta 570	>2.200
Portadores estimados (%)*	~11%	~55%	~67%
Media estimada de mutaciones/individuo**	1	1,7	2,7
Profundidad media	150X	150X	150X
Test complementarios	H/M: CYP21A2, HBA1/2, SMN1 M sólo: DMD, FMR1, FB	H/M: CYP21A2, HBA1/2, SMN1 M sólo: DMD, FMR1, FB	H/M: CYP21A2, HBA1/2, SMN1 M sólo: DMD, FMR1, FB
Muestra	Sangre	Sangre	Sangre
Tiempo entrega resultados	20 días laborables	20 días laborables	20 días laborables

KEY

C Copy number analysis

S Full Sequencing Analysis

‡ SMA Silent Carrier Analysis

CGG CGG Repeat Analysis

***** Females Only

ACMG AND ACOG

Alpha-Thalassemia (HBA1 and HBA2)

C S

Fanconi Anemia (FANCC)

S

Beta-Hemoglobinopathies (Beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease, HBB)

C S

Fragile-X Syndrome (FMR1) *

CGG

Bloom Syndrome (BLM)

S

Gaucher Disease (GBA)

S

Canavan Disease (ASPA)

S

Mucopolidosis IV (MCOLN1)

C S

Cystic Fibrosis (CFTR)

C S

Niemann-Pick Disease, Type A (SMPD1)

S

Duchenne/Becker Muscular Dystrophy (DMD) *

C S

Spinal Muscular Atrophy (SMN1) ‡

C

Familial Dysautonomia (IKBKAP)

S

Tay-Sachs Disease (HEXA)

C S

Test de portadores - Resultados



Es portador/a de una variante con implicancia clínica en uno de los genes estudiados. Se deberá correlacionar este resultado con el de la pareja y en función de ello definir el riesgo reproductivo.



No es portador/a de ninguna de variantes con implicancia clínica en los genes estudiados. Si su pareja también es negativa se podrá buscar un embarazo con la tranquilidad de que sus hijo/as no heredarán las enfermedades recesivas analizadas.

ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

Comprehensive carrier genetic test using next-generation deoxyribonucleic acid sequencing in infertile couples wishing to conceive through assisted reproductive technology

Julio Martin, Ph.D.,^a Asan, Ph.D.,^b Yuting Yi, M.S.,^b Trinidad Alberola, Ph.D.,^a Beatriz Rodríguez-Iglesias, Ph.D.,^a Jorge Jiménez-Almazán, Ph.D.,^a Qin Li, B.S.,^c Huiqian Du, M.S.,^b Pilar Alama, M.D.,^d Amparo Ruiz, M.D.,^d Ernesto Bosch, M.D.,^d Nicolas Garrido, Ph.D.,^c and Carlos Simon, M.D.^{a,d,e}

Objective: To develop an expanded pan-ethnic preconception carrier genetic screening test for use in assisted reproductive technology (ART) patients and donors.

Design: Retrospective analysis of results obtained from 2,570 analyses.

Setting: Reproductive genetic laboratory.

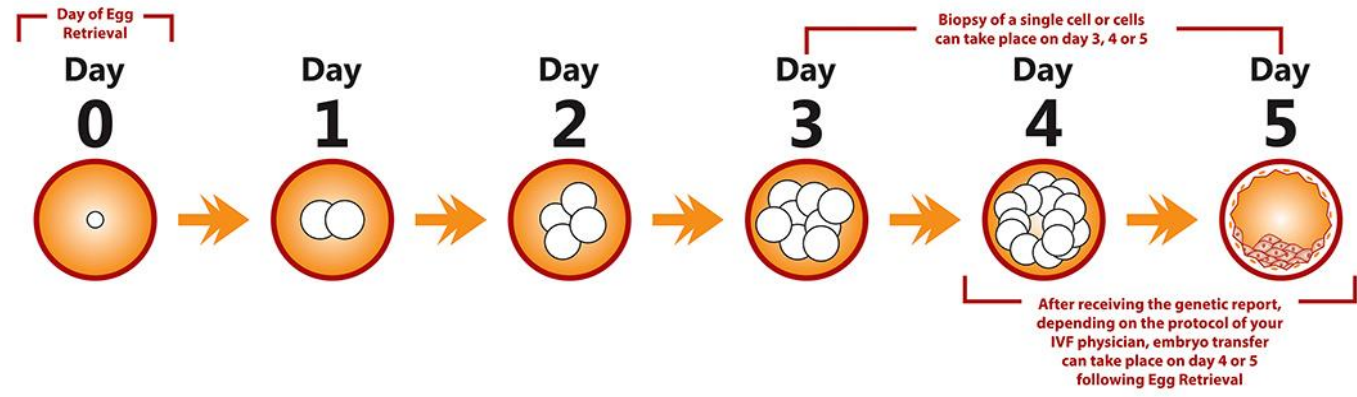
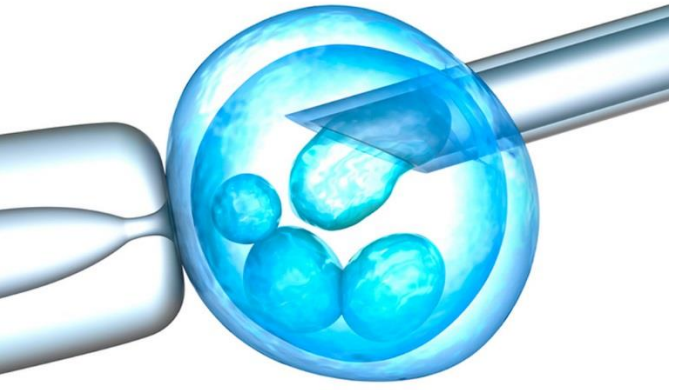
Patient(s): The 2,570 samples comprised 1,170 individuals from the gamete donor programs; 1,124 individuals corresponding to the partner of the patient receiving the donated gamete; and 276 individuals from 138 couples seeking ART using their own gametes.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Next-generation sequencing of 549 recessive and X-linked genes involved in severe childhood phenotypes reinforced with five complementary tests covering high prevalent mutations not detected by next-generation sequencing.

Result(s): Preclinical validation included 48 DNA samples carrying known mutations for 27 genes, resulting in a sensitivity of 99%. In the clinical dataset, 2,161 samples (84%) tested positive, with an average carrier burden of 2.3 per sample. Five percent of the couples using their own gametes were found to have pathogenic variants conferring high risk for six different diseases. These high-risk couples and patients received genetic counseling and recommendations for preimplantation genetic diagnosis. For patients receiving gamete donation, we applied a genetic testing and blinded matching system to avoid high-risk combinations regardless of their carrier burden. For female donors, 1.94% were positive for X-linked conditions; they received genetic counselling and were discarded.

PREIMPLANTACIONAL



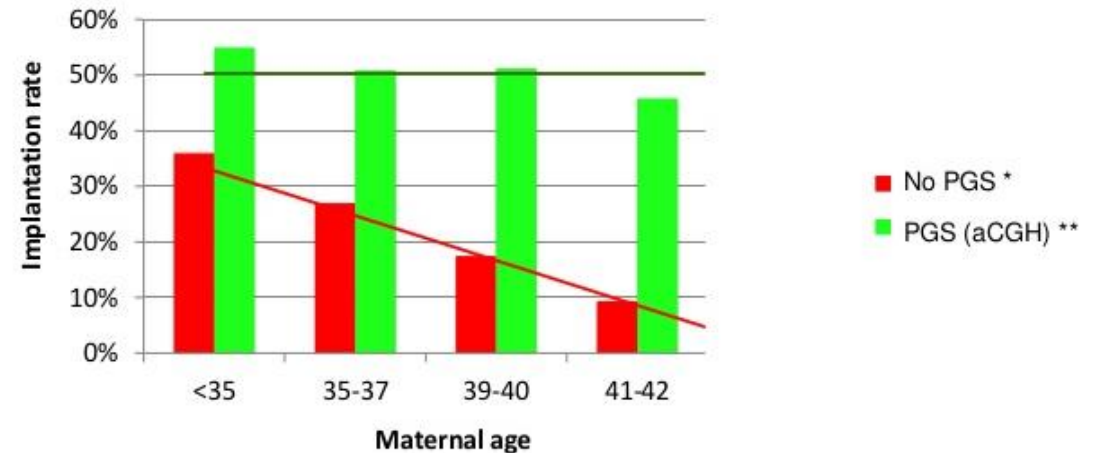
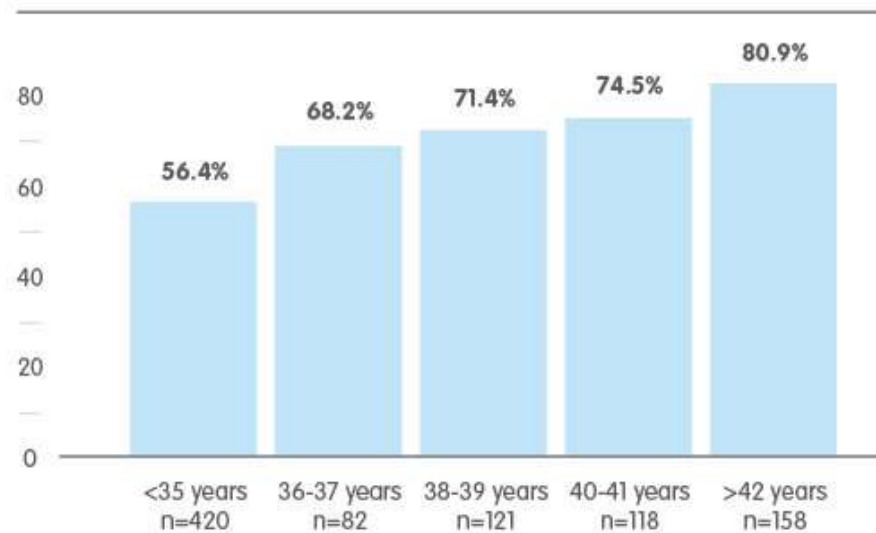
PGT-A: Aneuploidías
ERA: Receptividad endometrial
PGT-M → Mendelianas

PGT-A



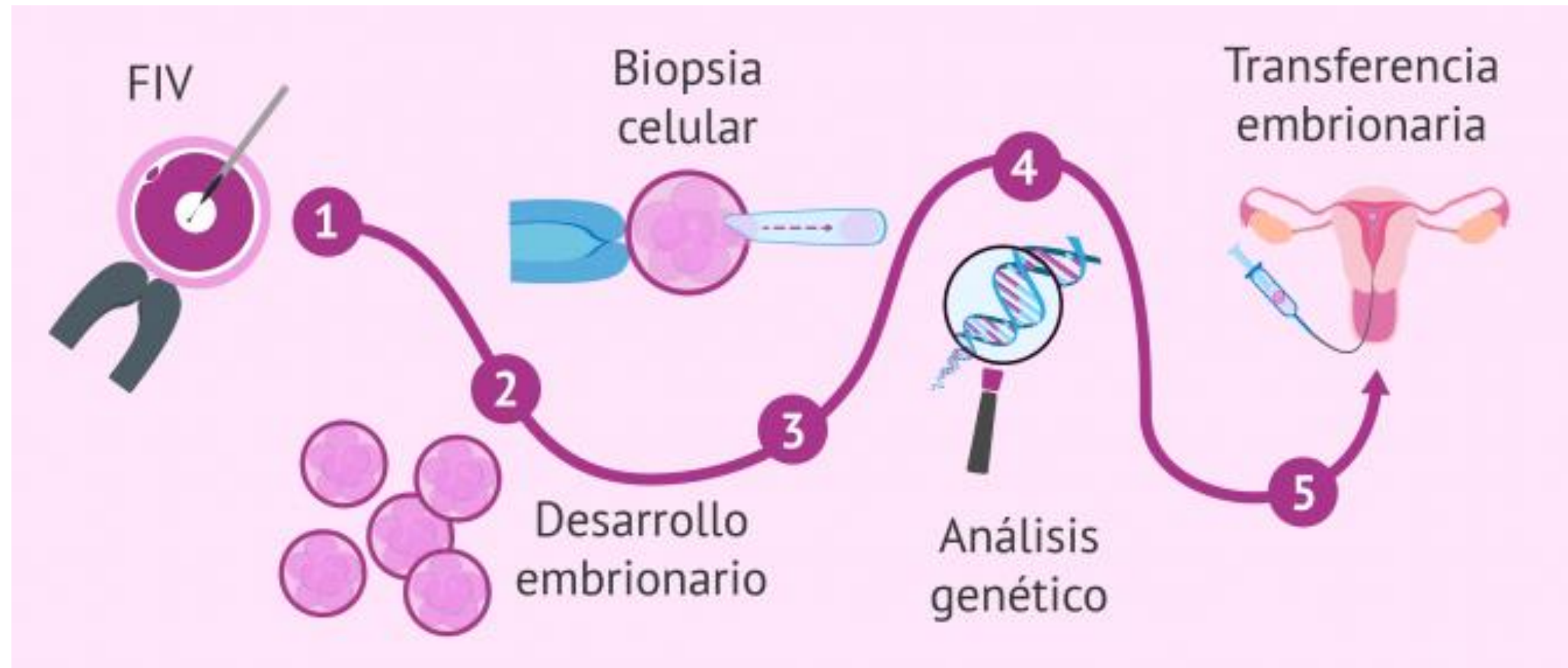
- Selección de embriones euploides en FIV.
- El aumento de la edad materna conlleva un aumento de embriones aneuploides.
- *PGT: Test Genético Preimplantacional* - A partir de biopsia embrionaria (D5) se realiza el análisis de aneuploidías en células del embrión.
- Mejora la tasa de embarazo y nacidos.
- Problemática: escasa cantidad de ovocitos a mayor edad materna.

Abnormal embryos per age



* SART 2011

** Harton, Munné et al. (2013) *Fertil Steril*. And unpublished data to 8/2013. N >800 blast biopsies



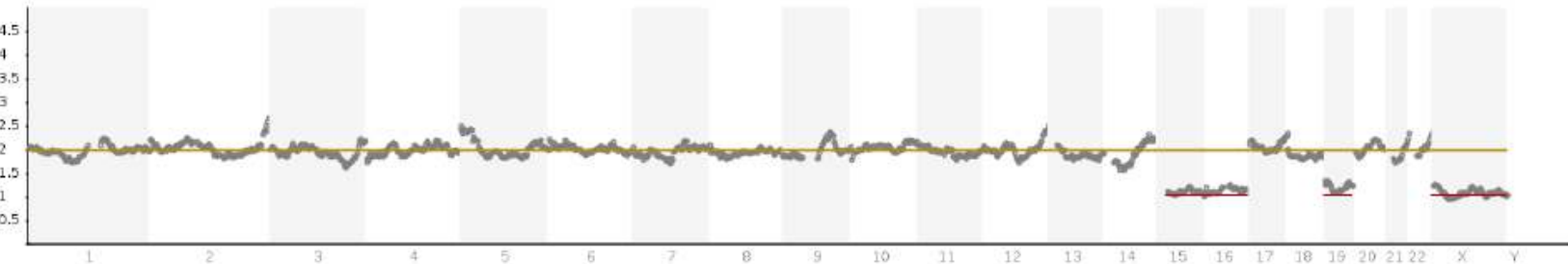
Resultados PGT-A



Resultado: 42, X0, -15, -16, -19

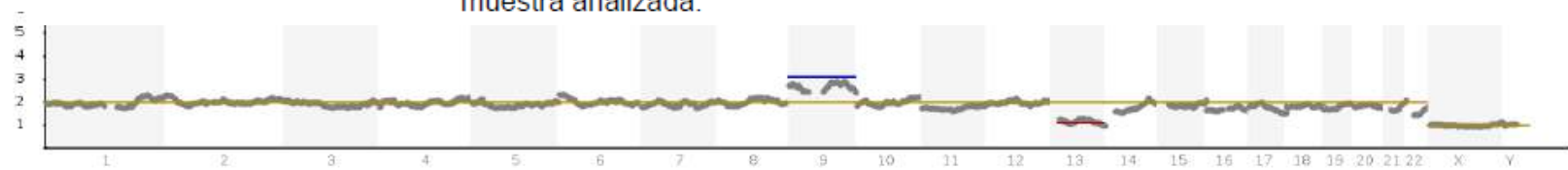
Interpretación: Con la metodología utilizada, se detectan múltiples monosomías cromosómicas, es decir, la presencia de una sola copia de los cromosomas X, 15, 16 y 19 en la muestra analizada.

Para quién??
Edad Reproductiva avanzada
Fallo de implantación (+ 2)
Abortos recurrentes (+ 2)



Resultado: 46, XY, +9, -13

Interpretación: Con la metodología utilizada, se detecta trisomía del cromosoma 9, es decir, la presencia de tres copias del cromosoma 9, además se detecta monosomía del cromosoma 13, es decir, la presencia de una sola copia del cromosoma 13 en la muestra analizada.



NICS: Noninvasive Chromosome Screening



Método basado en WGS para la detección de aneuploidías o traslocaciones desbalanceadas, a partir del ADN secretado por los blastocistos al medio de cultivo.

Ventajas:

Evitar la biopsia del embrión
Metodología *a priori* menos compleja y menos costosa

Limitaciones:

FN → presencia de células del *cumulus* (origen materno)
FP → se piensa que pueden ser mosaico, células que el embrión elimina (rescate de trisomía)

- **Serviría principalmente para la selección de embriones euploides, y cuando fuese aneuploide se debería confirmar por método invasivo.**
- **Falsos negativos es un gran problema si se logra el embarazo.**

¿Qué es EMBRACE?

EMBRACE es el nuevo test no invasivo desarrollado por Igenomix que permite a la clínica identificar los embriones con mayores probabilidades de ser cromosómicamente normales.

Con esta información, el especialista podrá decidir qué embrión transferir en primer lugar en un ciclo de FIV para mejorar las posibilidades de conseguir el embarazo de un bebé sano.

Resultados del Test

Los embriones con mayores probabilidades obtendrán la puntuación más alta y tendrán prioridad para la transferencia



¿Cómo funciona?

Los embriones permaneces seguros en la clínica de FIV

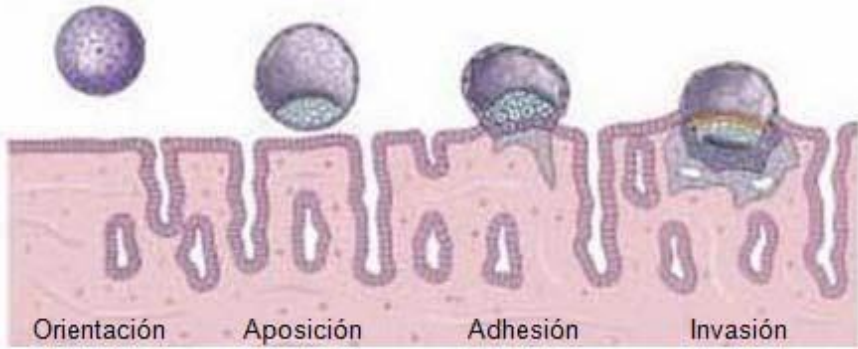


¿A quién va dirigido?

EMBRACE es para todas las pacientes que quieren aumentar sus posibilidades de embarazo sin emplear técnicas invasivas.

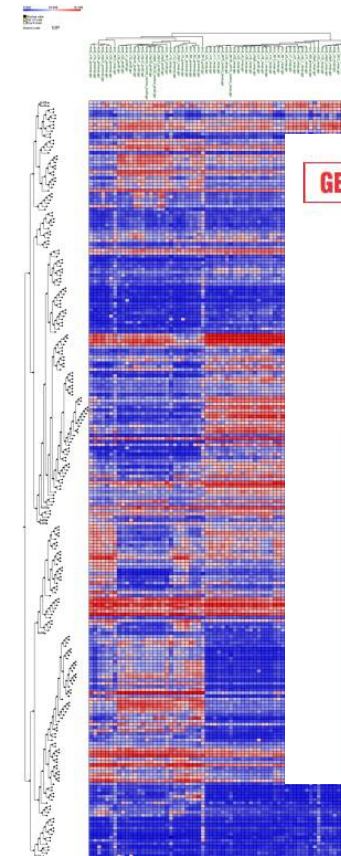
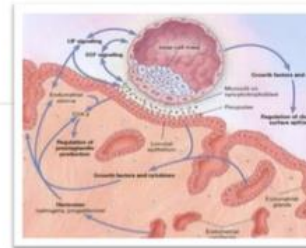
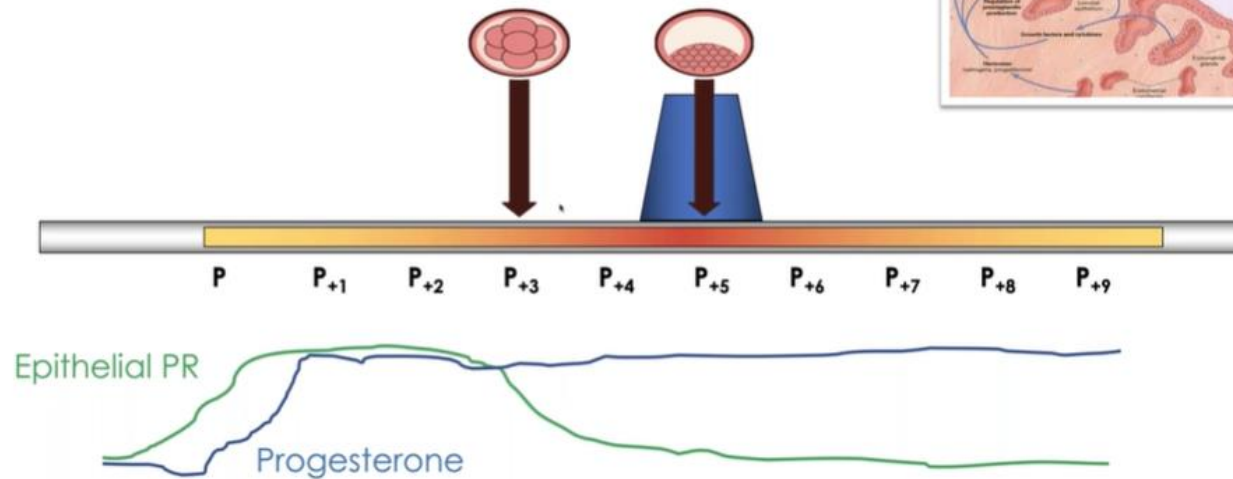


ERA: Análisis de Receptividad Endometrial



El endometrio varía a lo largo del ciclo menstrual y su principal función es la de estar preparado para la implantación embrionaria y la gestación.

Window of Endometrial Receptivity



GENETICS

A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature

Patricia Díaz-Gimeno, Ph.D.,^{a,b} José A. Horcajadas, Ph.D.,^c José A. Martínez-Conejero, Ph.D.,^c Francisco J. Esteban, Ph.D.,^d Pilar Alamá, M.D.,^{a,b} Antonio Pellicer, M.D.,^{a,b} and Carlos Simón, M.D.^{a,b,c}

^aFundación IVI-Instituto Universitario IVI, University of Valencia, Valencia; ^bInstituto de Investigación, Sanitaria del Hospital Clínico de Valencia, Valencia University, Valencia; ^cGenomax, Valencia; ^dDepartment of Experimental Biology, University of Jaén, Jaén; and ^eCentro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

Objective: To create a genomic tool composed of a customized microarray and a bioinformatic predictor for endometrial dating and to detect pathologies of endometrial origin. To define the transcriptomic signature of human endometrial receptivity.

Design: Two cohorts of endometrial samples along the menstrual cycle were used: one to select the genes to be included in the customized microarray (endometrial receptivity array [ERA]), and the other to be analyzed by ERA to train the predictor for endometrial dating and to define the transcriptomic signature. A third cohort including pathological endometrial samples was used to train the predictor for pathological classification.

Setting: Healthy oocyte donors and patients.

Patient(s): Healthy fertile women (88) and women with implantation failure (5) or hydrosalpinx (2).

Intervention(s): Human endometrial biopsies.

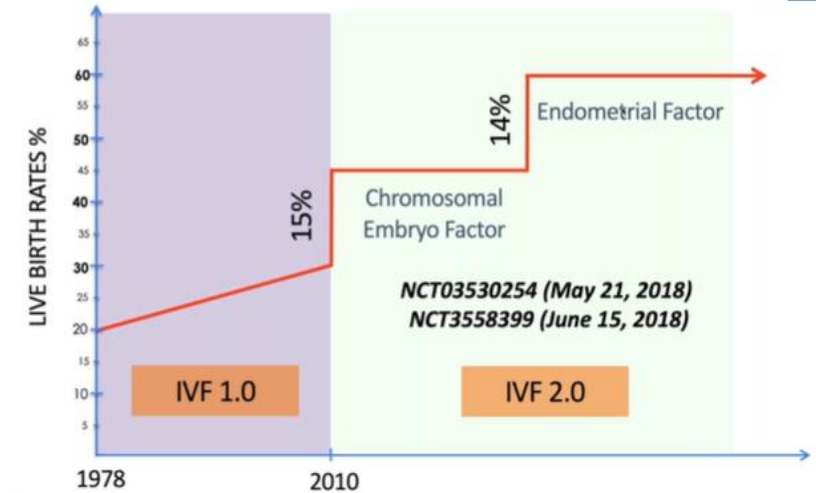
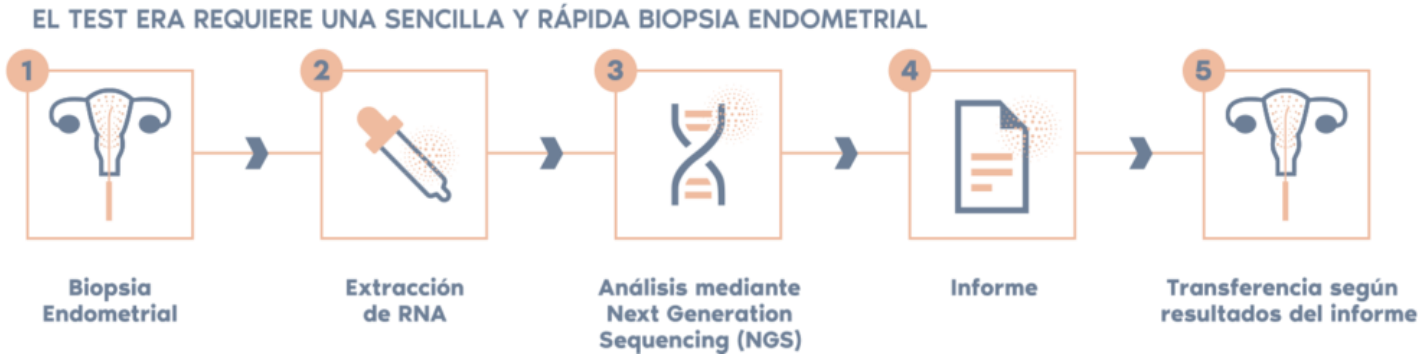
Main Outcome Measure(s): The gene expression of endometrial biopsies.

Result(s): The ERA included 238 selected genes. The transcriptomic signature was defined by 134 genes. The predictor showed a specificity of 0.8857 and sensitivity of 0.99758 for endometrial dating, and a specificity of 0.1571 and a sensitivity of 0.995 for the pathological classification.

Conclusion(s): This diagnostic tool can be used clinically in reproductive medicine and gynecology. The transcriptomic signature is a potential endometrial receptivity biomarkers cluster. (Fertil Steril® 2011;95:50-60. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Endometrial receptivity, endometrial dating, microarray, transcriptomic signature, predictor, diagnostic tool

pET: Transferencia Embrionaria Personalizada



Para quién? Mujeres en las que se ha producido falla con embriones euploides y con útero morfológicamente y anatómicamente normal

Para qué? Permite determinar la ventana de implantación personalizada y establecer en función del resultado una transferencia de embriones personalizada

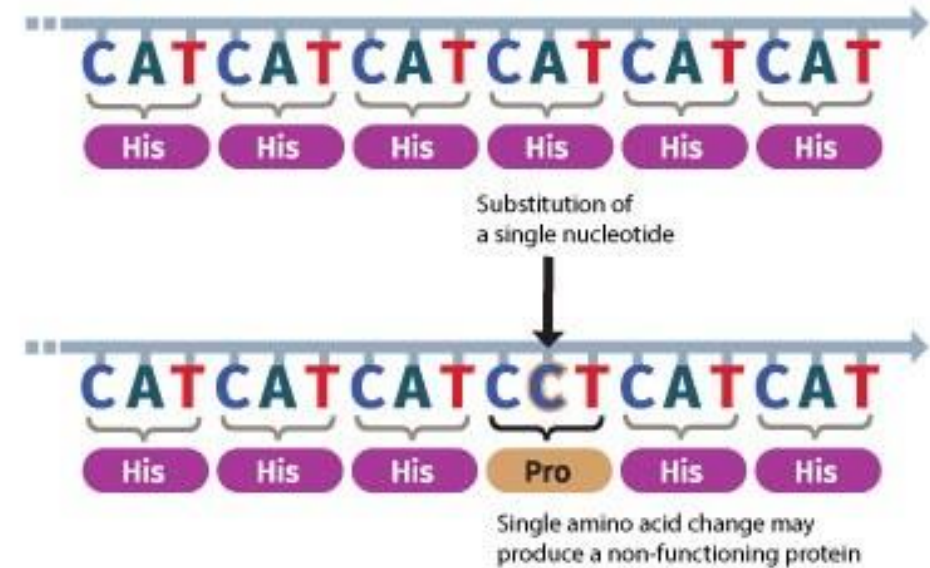
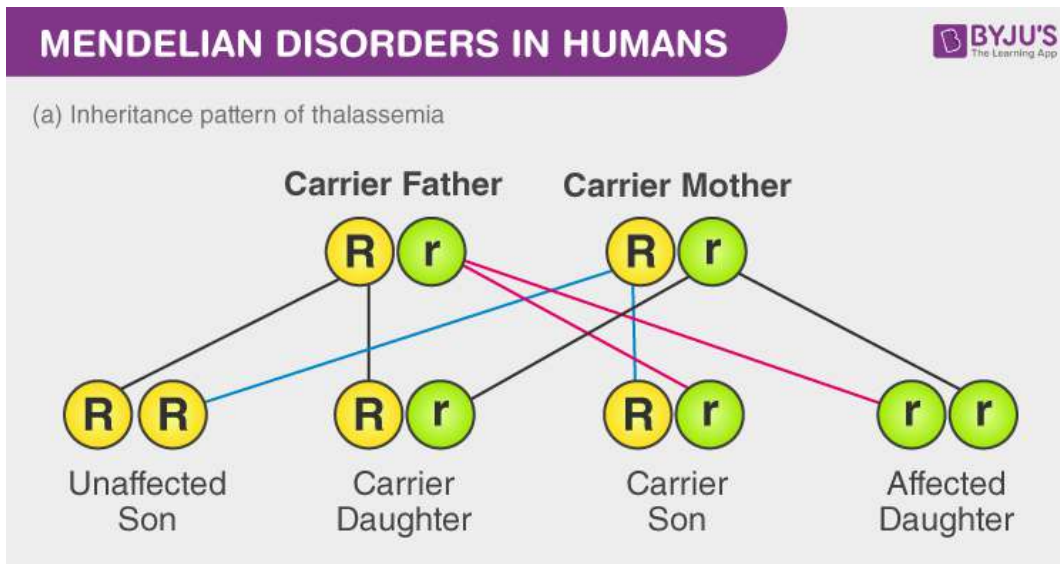
Cómo y qué?

- Biopsia endometrial en día LH+7 (ciclo natural) o día P+5 (ciclo sustituido).
- Se analiza la expresión de más de 200 genes implicados en la receptividad endometrial.
- Los datos obtenidos clasifican al endometrio como receptivo o no receptivo.

PGT-M: Test genético preimplantacional para enfermedades Mendelianas

Para quién? Parejas con riesgo de tener descendencia con un desorden causado por una variante patogénica conocida (monogénico).

Para qué? Selección de embriones que no sean portadores de la variante en cuestión a buscar. Se selecciona además embriones euploides.



PRENATAL



Objetivo

Detectar precozmente anomalías congénitas con el fin de:

- Brindar **tratamiento** prenatal o perinatal
- **Tomar acciones** al momento del parto para controlar la afección
- **Interrupción voluntaria** del embarazo
- **Preparación emocional** para los progenitores

- La mayoría de la información que se obtiene de **forma no invasiva es de carácter indirecto**
- La información **directa es de carácter invasivo** (VC, LA)
- Diagnóstico **contrarreloj**
- **Desafío en el asesoramiento** por mosaicismos, expresividad variable, penetrancia incompleta, etc.

Técnicas invasivas

- ✓ Riesgo genético mayor al riesgo de la prueba invasiva
- ✓ Cribado combinado de alto riesgo
- ✓ Malformación ecográfica
- ✓ Antecedentes familiares fuertes
- ✓ Ansiedad o angustia materna

BIOPSIA CORIAL

Semana 10-13

Más precoz

Técnica agresiva

Contaminación materna

Células del trofoectodermo



AMNIOCENTESIS

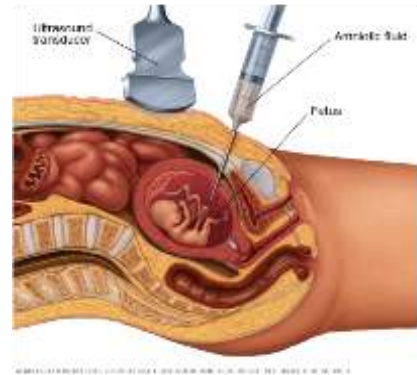
Semana 15-20

Técnica más habitual

Menor riesgo (expertiz)

Más fiabilidad diagnóstica

Células epiteliales (piel y sistema urinario)



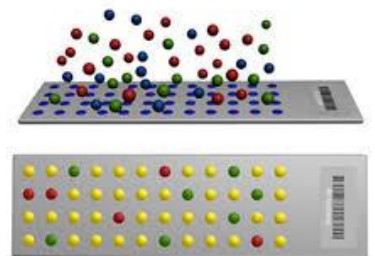
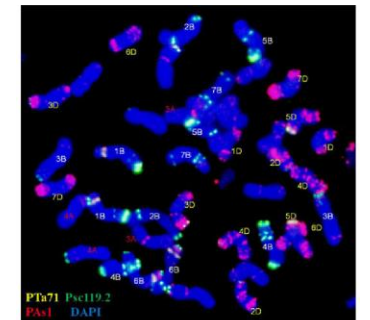
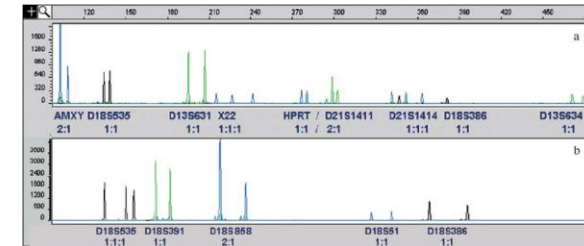
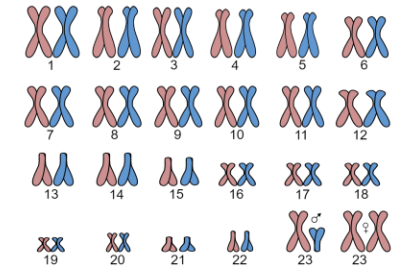
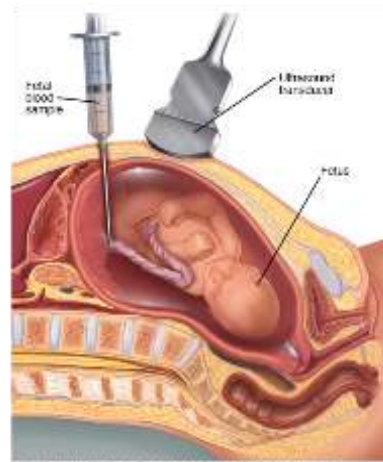
CORDOCENTESIS

Semana 18-20

Dificultad técnica

Riesgo fetal alto

Sólo para técnicas diagnósticas específicas



Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)



RESEARCH

BMJ

Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study

Rossa W K Chiu, professor,¹ Ranjit Akolekar, clinical research fellow,¹ Yama W L Zheng, student,¹ Tak Y Leung, professor,² Hao Sun, assistant professor,¹ K C Ai fellow,³ Attie T H Go, professor,² Elizabeth T Lai, William W K Lo, consultant,⁴ Wing C Leung, consultant,⁵ Helena Lam, consultant,¹⁰ Yu Y Kun Yugt, professor,⁶ Ryoko Minekawa, postdoctoral associate professor,⁷ Jun Wang, professor,¹² Tze K Lau, professor,² Kypros H Nicolaides, professor,³ Y M Dennis Lo, professor^{1,12}

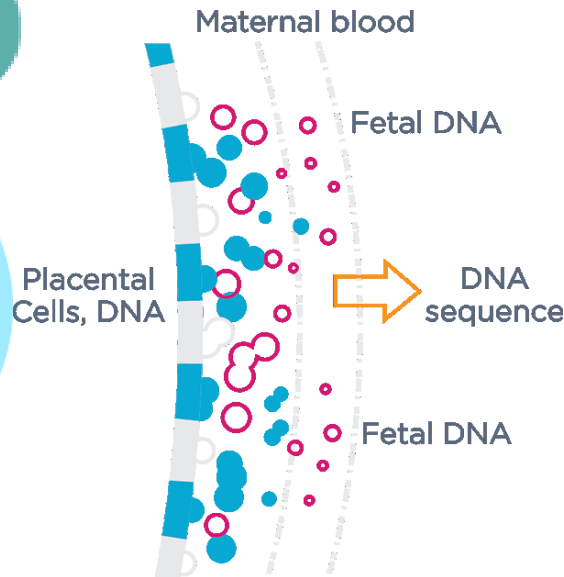
Análisis Trisomía 21: 753 embarazadas
Sensibilidad: 100%
Especificidad: 97.9%

postdoctoral
 it professor,²
 C Au-Yeung,
 John M G van
 rary clinical
 le professor,⁹

¹Centre for Research into Circulating Fetal Nucleic Acids, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, Department of Clinical Pathology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China
²Department of Obstetrics and Gynaecology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China

ABSTRACT
Objectives To validate the clinical efficacy and practical feasibility of massively parallel maternal plasma DNA sequencing to screen for fetal trisomy 21 among high risk pregnancies clinically indicated for amniocentesis or chorionic villus sampling.

Conclusion Multiplexed maternal plasma DNA sequencing analysis could be used to rule out fetal trisomy 21 among high risk pregnancies. If referrals for amniocentesis or chorionic villus sampling were based on the sequencing test results, about 98% of the invasive diagnostic procedures could be avoided.



Ácidos nucleicos circulantes en plasma (CNAs)

Descubiertos en 1948

1989 se asocia a cáncer (Biopsia líquida)

1997 Lo et al. , presencia de CNAs fetales en plasma materno

Proviene de la apoptosis del trofoblasto (origen placentario)

Supone entre un 5-8% del ADN total materno

Crece durante el embarazo

Puede detectarse precozmente (semana 9)

Desaparece luego del parto

Contenido de ADN mayor que en células fetales

Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)



NIPT



Available from week 9

Integrated screening



Available from week 15

Serum integrated screening



Available from week 15

Quad screening



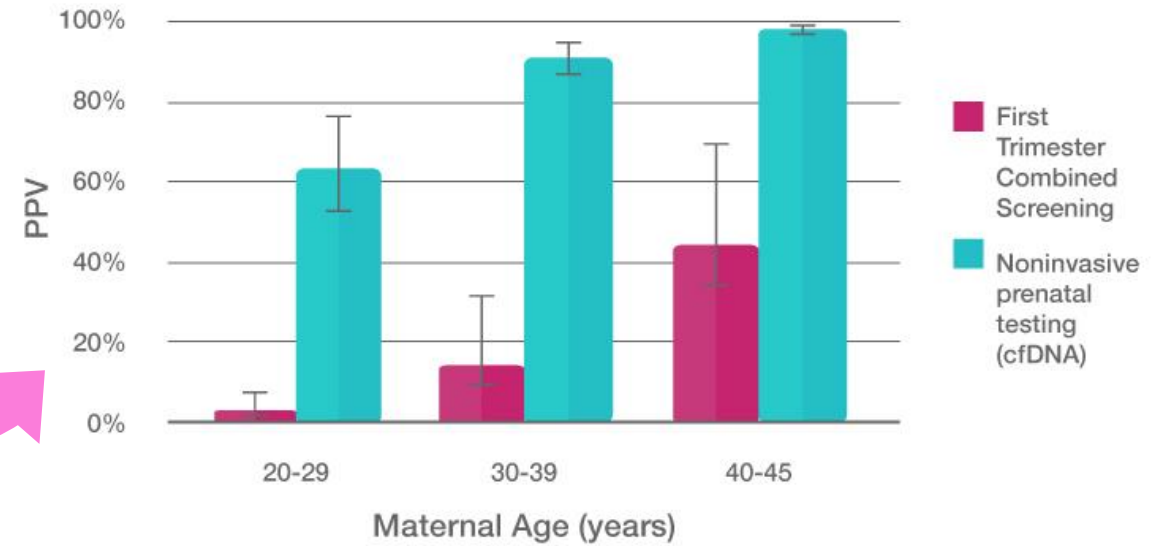
Available from week 15

First trimester screening



Available from week 10

Trisomy 21 PPVs: NIPT vs. First Trimester Combined Screening



PPV:VP/(VP+FP)

Tasa de Falsos Positivos:

Screening combinado: 5%

NIPT: 0.1%

Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)



1 BASIC NIPT

Trisomy 21 Down S.	Trisomy 18 Edwards S.	Trisomy 13 Patau S.	Monosomy X Turner S.	Fetal sex	Triploidy
-----------------------	--------------------------	------------------------	-------------------------	-----------	-----------

2 BASIC NIPT + 22q11.2

Trisomy 21 Down S.	Trisomy 18 Edwards S.	Trisomy 13 Patau S.	Monosomy X Turner S.	Fetal sex	Triploidy	+	22q11.2 DiGeorge S.
-----------------------	--------------------------	------------------------	-------------------------	-----------	-----------	---	------------------------

3 EXTENDED NIPT

Trisomy 21 Down S.	Trisomy 18 Edwards S.	Trisomy 13 Patau S.	Monosomy X Turner S.	Fetal sex	Triploidy	+	22q11.2 DiGeorge S.	1p36	5p Cri-du-Chat S.	15q11.2 Prader-Willi S. Angelman S.
-----------------------	--------------------------	------------------------	-------------------------	-----------	-----------	---	------------------------	------	----------------------	---

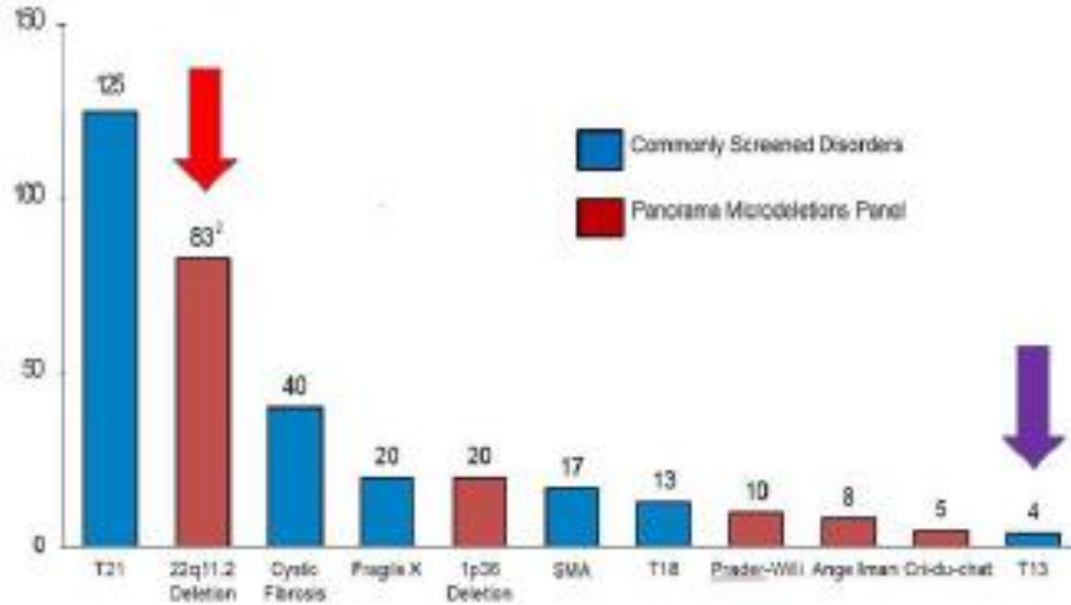
Microdeletions

Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT): CNVs



POSITIVE PREDICTIVE VALUE (PPV) OF THEORETICAL GENETIC TEST WITH FALSE POSITIVE RATE (FPR) OF 0.1%*

Incidence out of 100,000 Births¹



1. Hall, Panorama™ Non-Invasive Prenatal Screening for Microdeletion Syndromes, 2015.
 2. Greig, et al. Clinical experience with single-molecule polymerase chain reaction-based noninvasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014.

POSITIVE PREDICTIVE VALUE



Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT): RATs

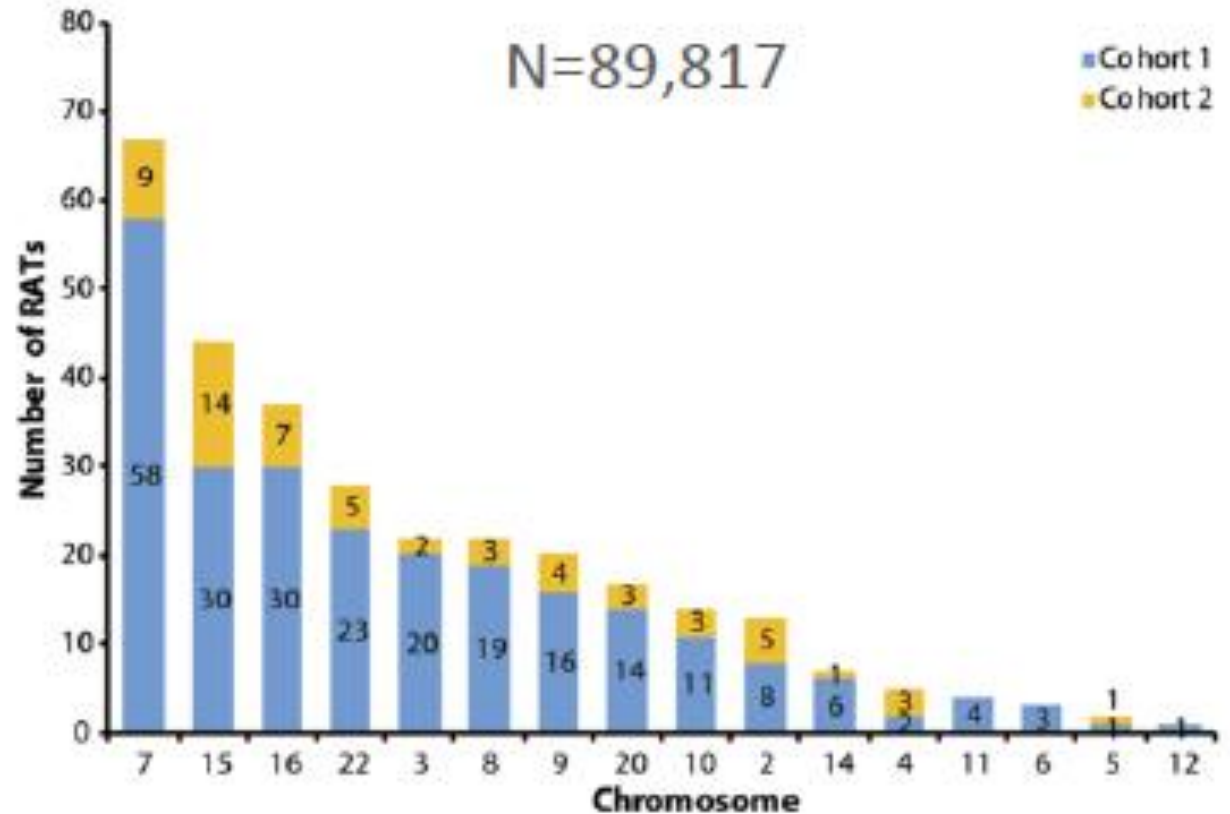
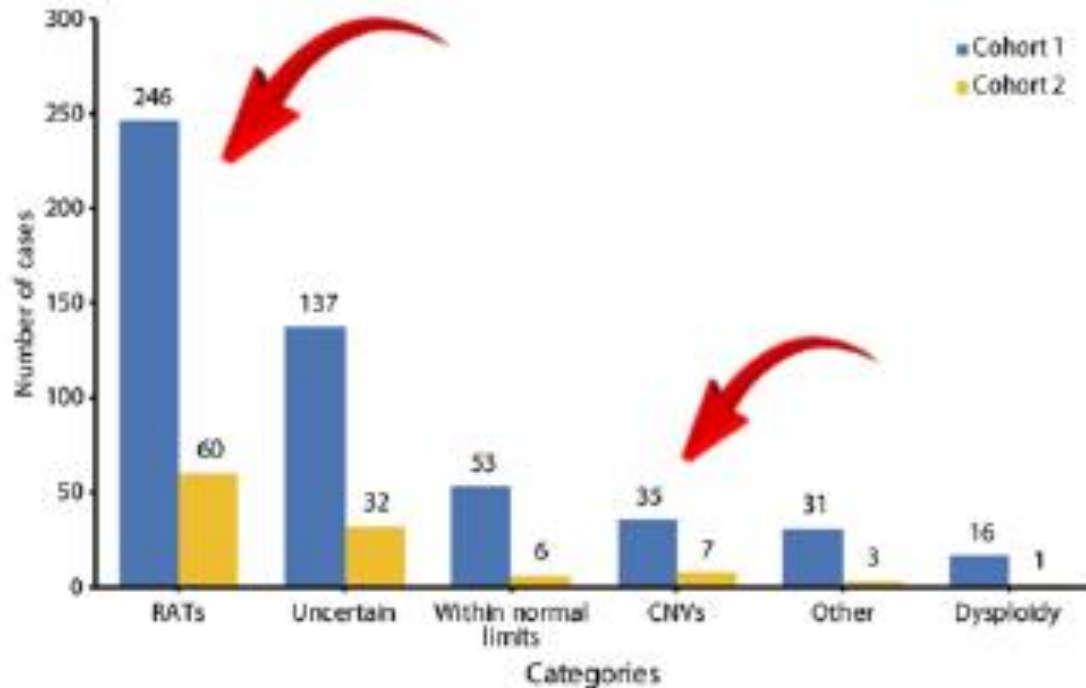


SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

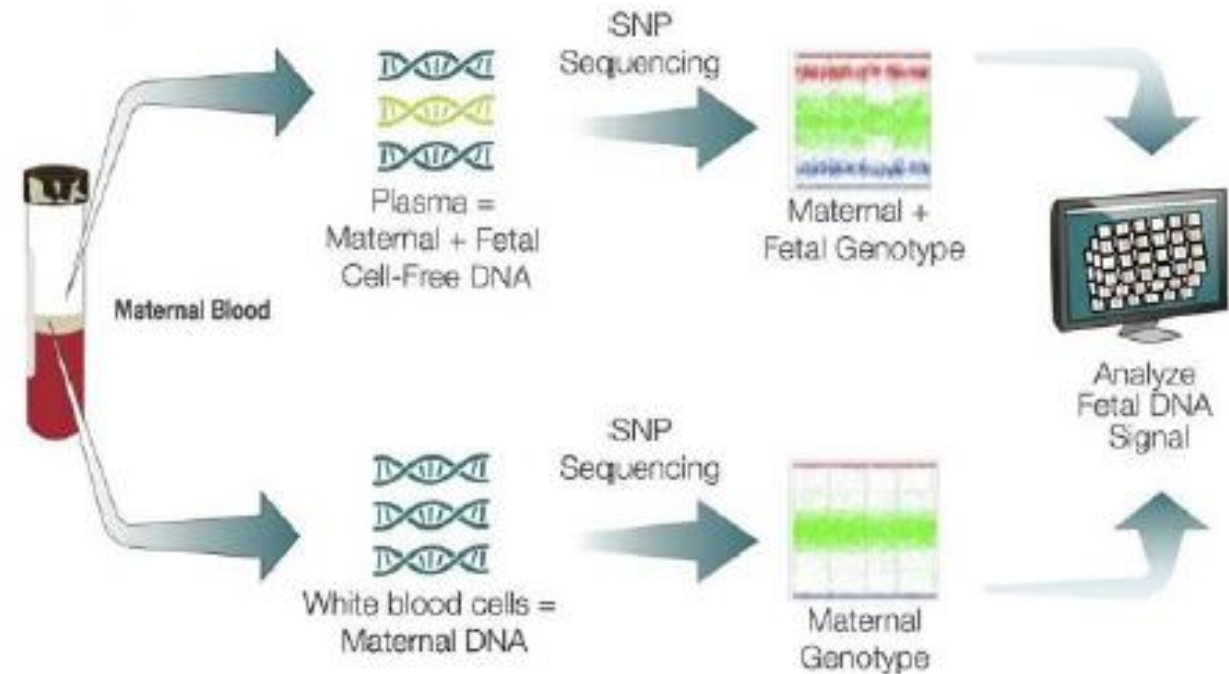
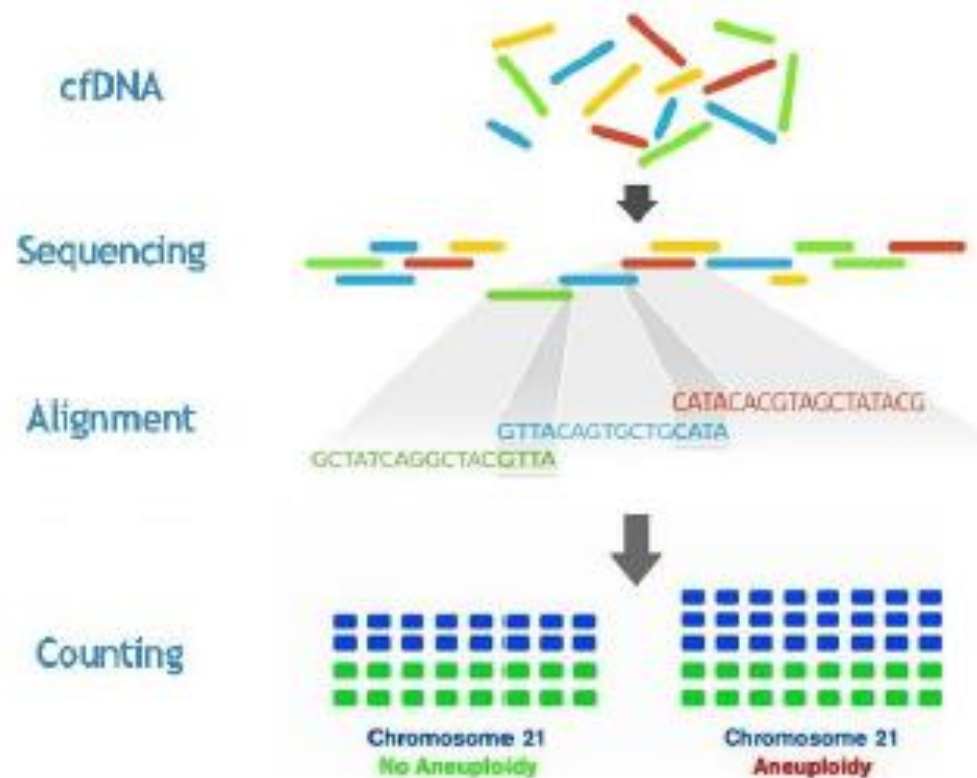
PREGNANCY

Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease

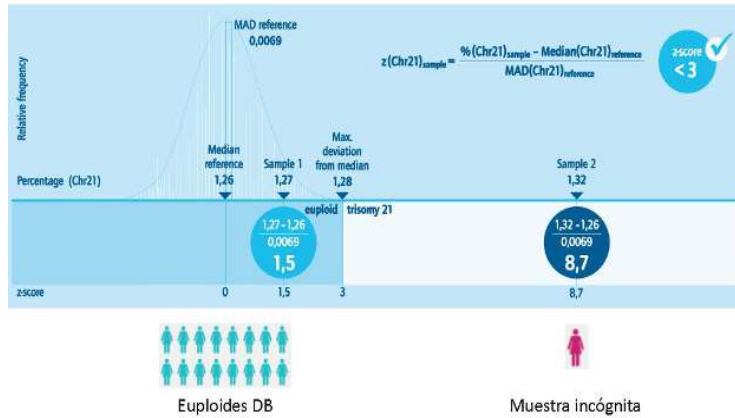
Mark D. Perito,^{1,2*} Meredith Halks-Miller,^{2,4*} Nicola Flowers,¹ Catalin Barbacidoni,⁴ Sarah L. Kinnings,³ Darcy Yavrek,³ William K. Seltzer,³ Diana W. Bianchi^{3,6*}



Metodología: Whole Genome vs Targeted



1- DB Euploide



2- Validación

Validación con controles comerciales



Cohorte de validación



3- Comercialización



+ de 1200 tests realizados

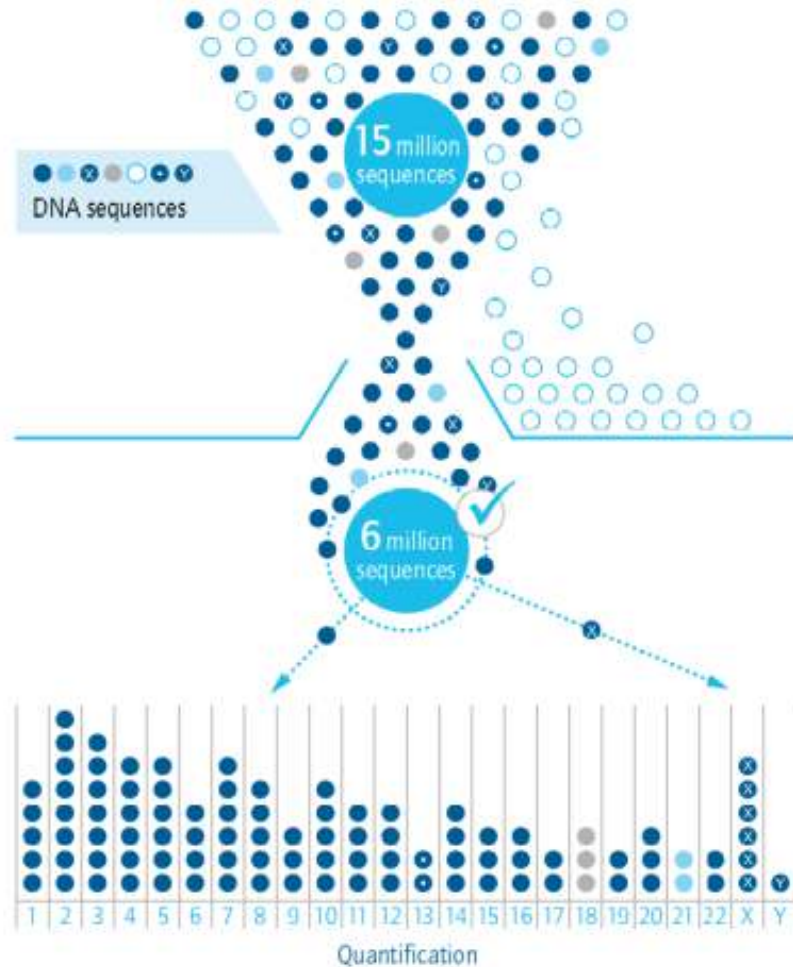
4- Seguimiento y mejora continua



Método de conteo estadístico

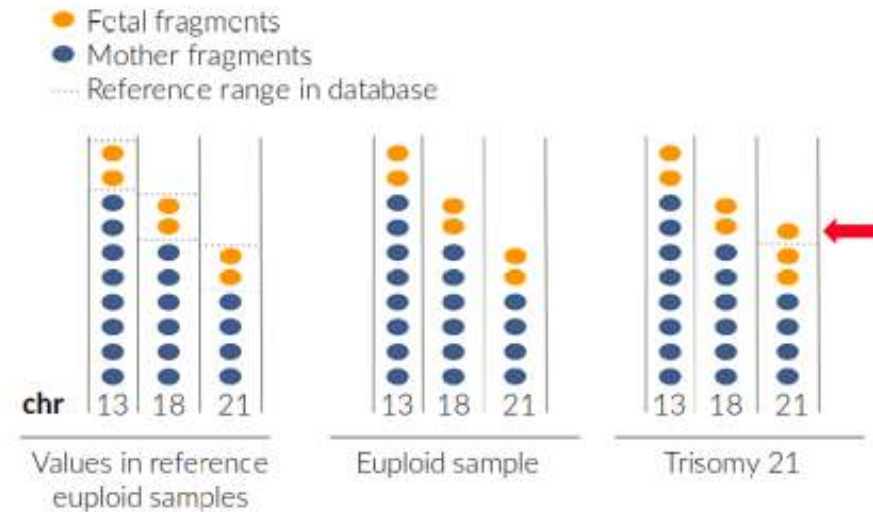


Filter high quality uniquely mapped reads



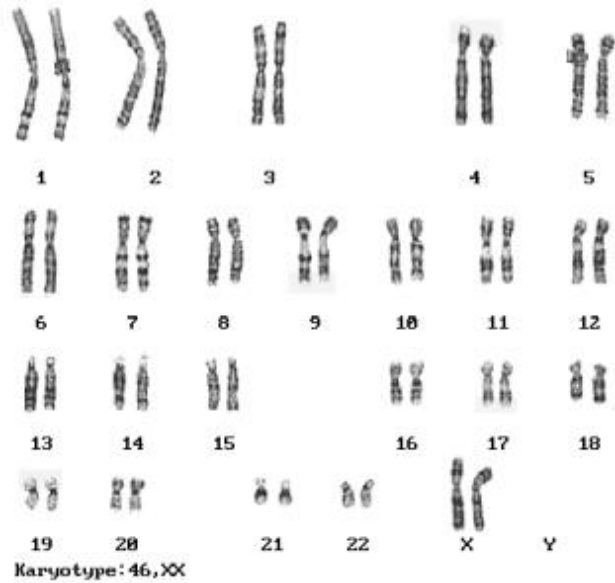
Counting Method

- NGS reads are mapped to chromosomes and counted
- Aneuploidies are detected by comparing the amount of chromosomal material (% reads mapped) against a set of reference chromosomes

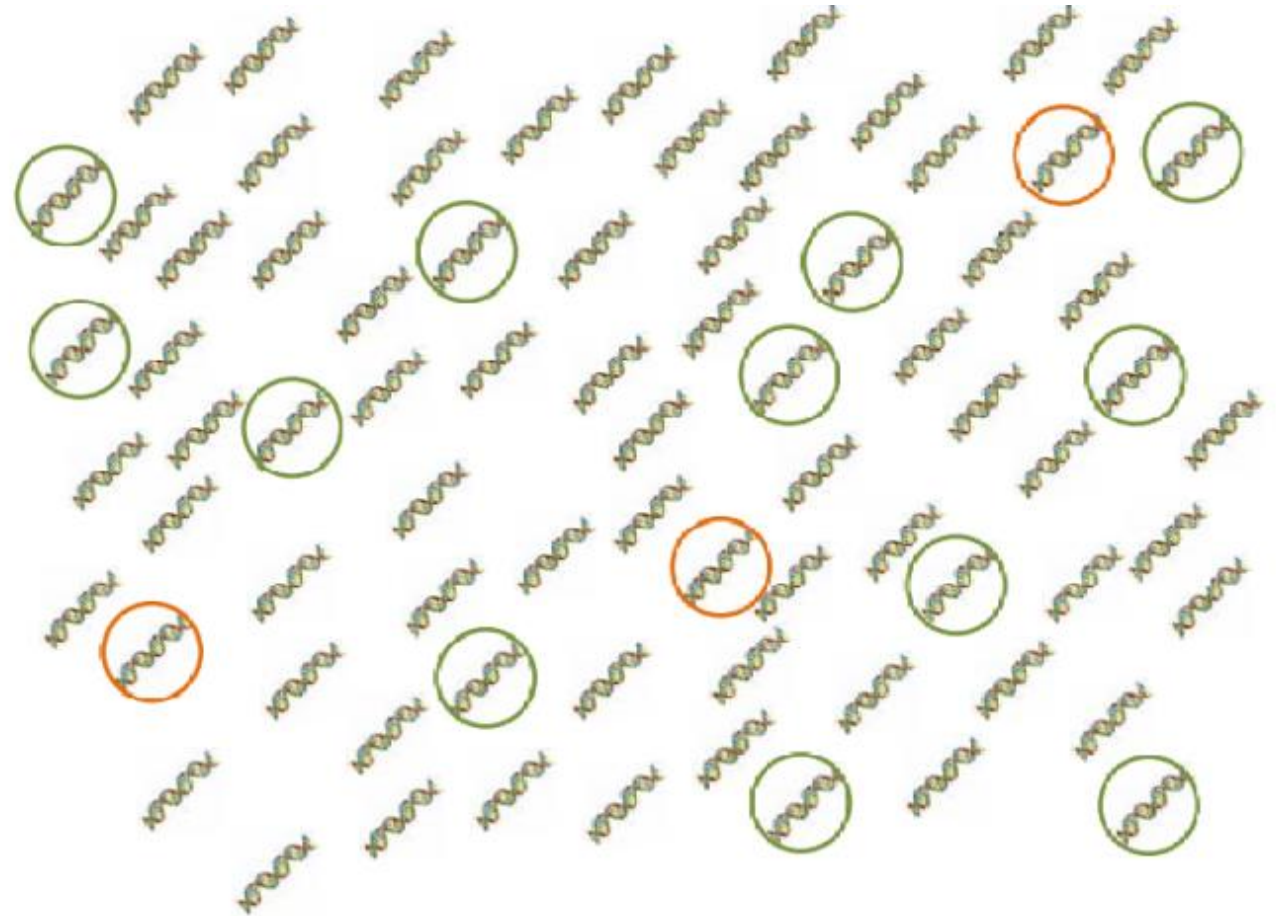


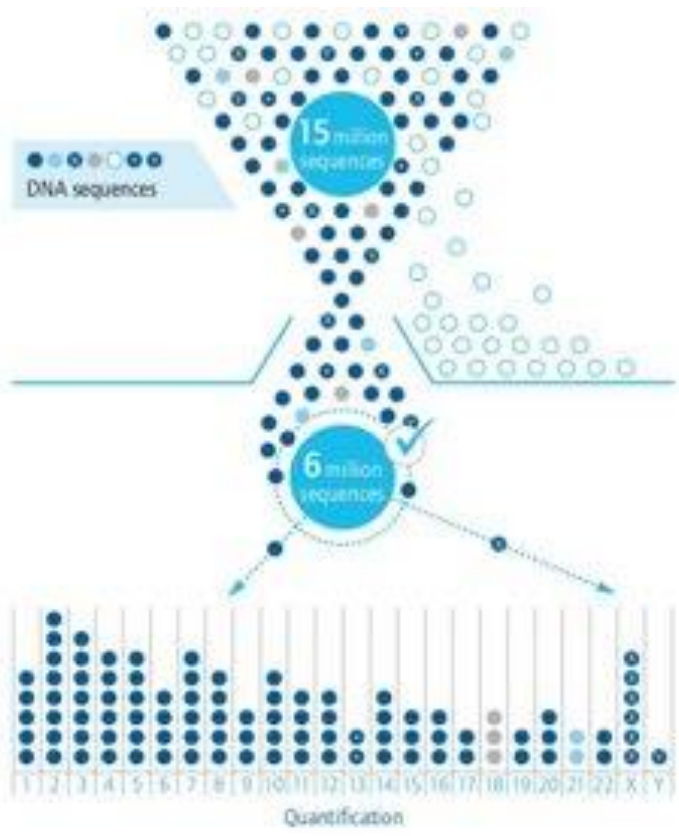
vision

PRENATAL NO INVASIVO



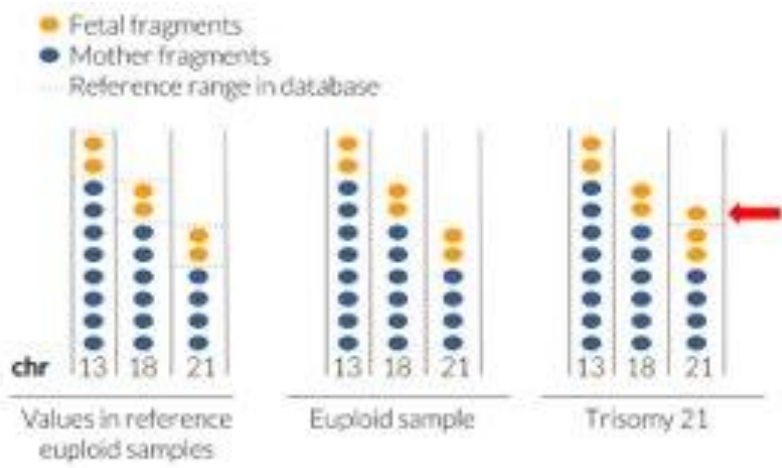
Chr21: 1.5% genome
Chr3: 6% genome





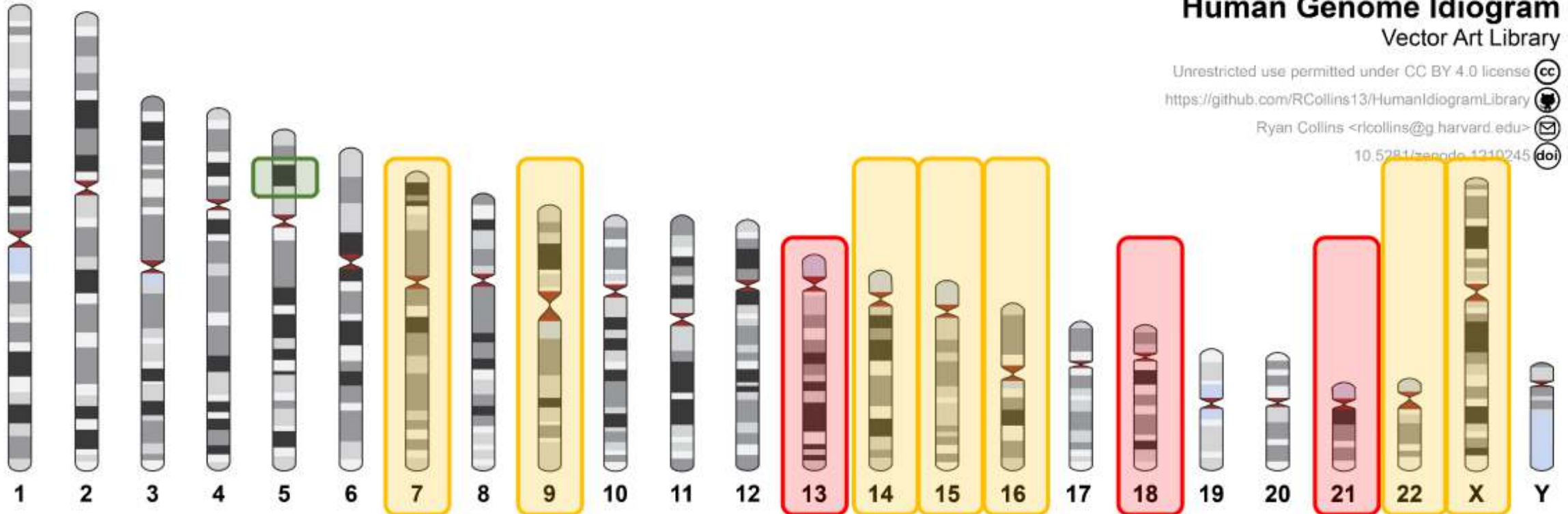
- % Fetal Fraction
- # MAPQ30 reads
- QS (Sample quality)
- Library performance

- 4 scores for chromosomal aneuploidies*
- Chromosome level plots
- Fetal sex prediction



- Tier I, Alto riesgo, Down, Edwards, Patau
- Tier II, Pérdida de embarazo frecuente, Sme Turner
- Tier IV, Microdelecciones/Microduplicaciones

¿Qué resultado reporta VISON?



Human Genome Idiogram
Vector Art Library

Unrestricted use permitted under CC BY 4.0 license
<https://github.com/RCollins13/HumanIdiogramLibrary>
Ryan Collins <ricollins@harvard.edu>
10.5281/zenodo.1210245

POSTNATAL



Objetivo

- Establecer las bases moleculares de la patología del paciente.
- Brindar herramientas que puedan utilizarse para la prognosis, tratamiento y asesoramiento familiar.
- Diferentes técnicas moleculares en función de la anomalía que se quiera identificar.



Cariotipo
FISH



Array (BACs, oligos,
SNPs, de expresión,
etc)



PCR (distintos
tipos)



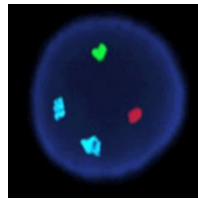
Secuenciador
Sanger



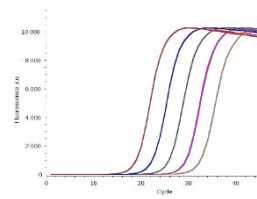
Next Generation
Sequencing



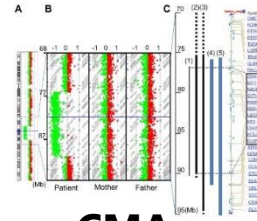
¿Cuál estudio es el mejor?



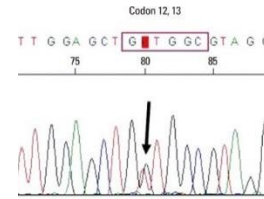
FISH



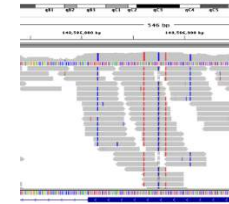
PCR



CMA

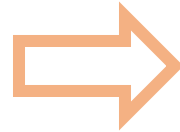


SANGER

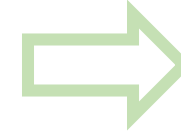


NGS

Evaluación clínica detallada:
Antecedentes familiares
Estudios previos
Sospecha clínica



Etiología del mecanismo molecular de sospecha



Técnica molecular más adecuada

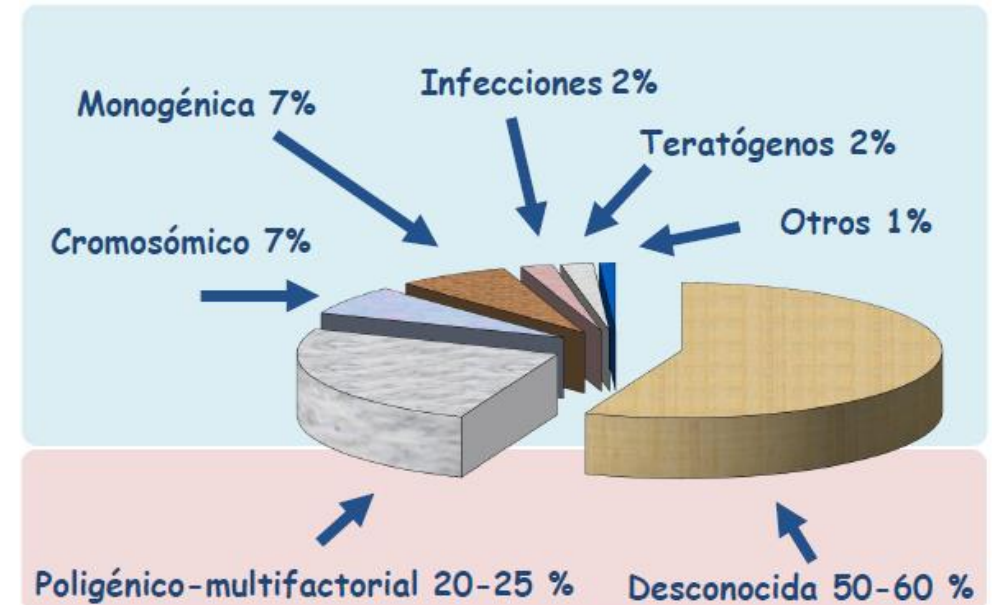


Anomalías Congénitas

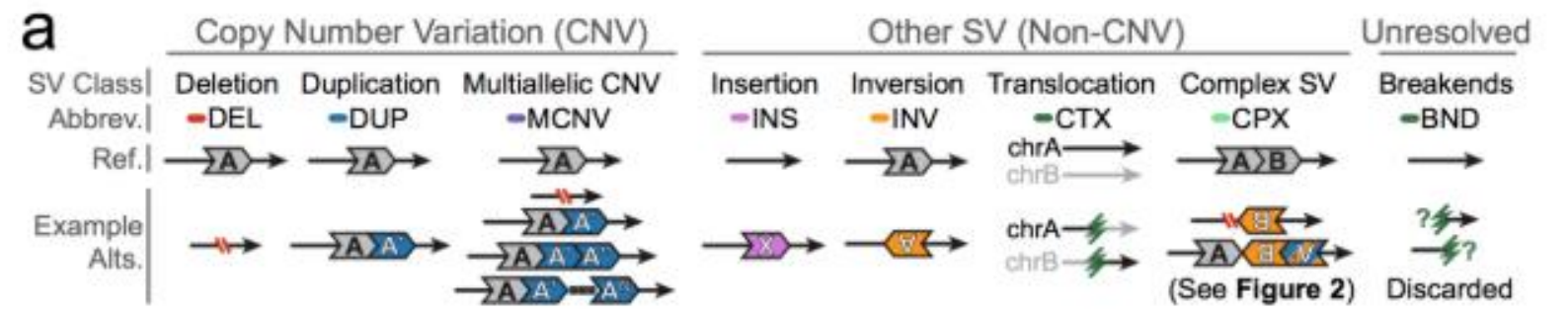


“Las anomalías congénitas se denominan también defectos de nacimiento, trastornos congénitos o malformaciones congénitas. Se trata de anomalías estructurales o funcionales, como los trastornos metabólicos, que ocurren durante la vida intrauterina y se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida”

- Se manifiestan de forma prenatal (ej.: polidactilia) o al nacimiento (ej.: sordera congénita)
- Afectan un 2-3% de los RNV
- La etiología de las anomalías congénitas es en gran parte desconocida, siendo algunas de ellas de origen genético.

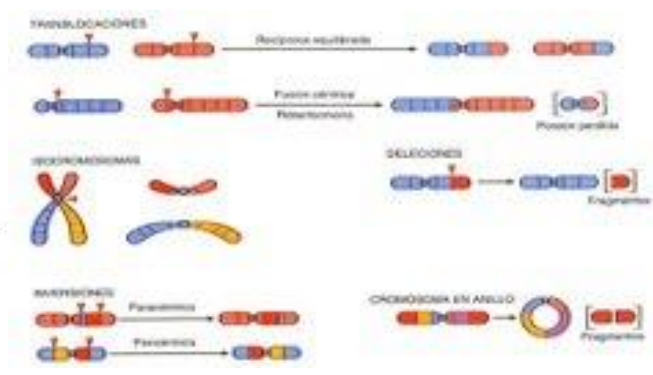
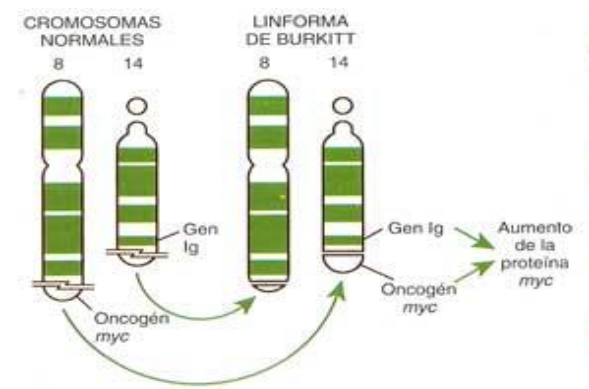
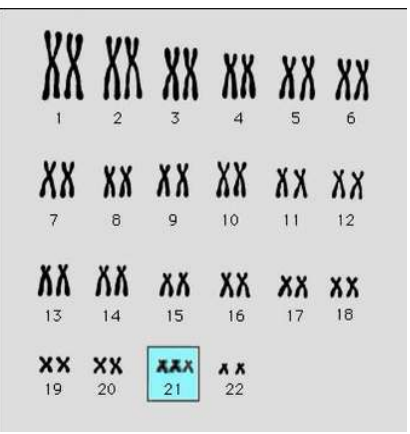


Anomalías Cromosómicas



NUMÉRICAS

ESTRUCTURALES





Síndromes de microdelección y microduplicación



Genetics and Molecular Biology, 37, 1 (suppl), 210-219 (2014)
Copyright © 2014, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

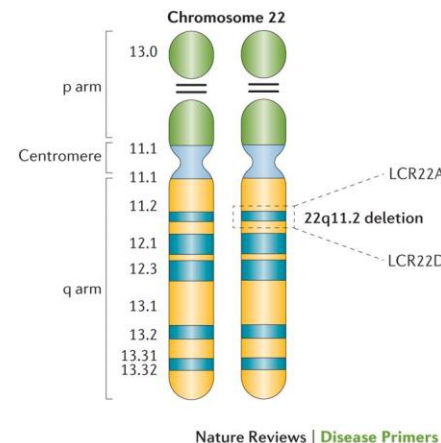
Review Article

New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review

Julián Nevado^{1,2*}, Rafaela Mergener^{3*}, María Palomares-Bralo^{1,2}, Karen Regina Souza³, Elena Vallespin^{1,2}, Rocío Mena^{1,2}, Víctor Martínez-Glez^{1,2}, María Ángeles Mori^{1,2}, Fernando Santos^{1,4}, Sixto García-Miñaur^{1,4}, Fè García-Santiago^{1,5}, Elena Mansilla^{1,5}, Luis Fernández^{1,6}, María Luisa de Torres^{1,5}, Mariluce Riegel^{3,7,8} and Pablo I. Aronavics^{1,4,8,9}

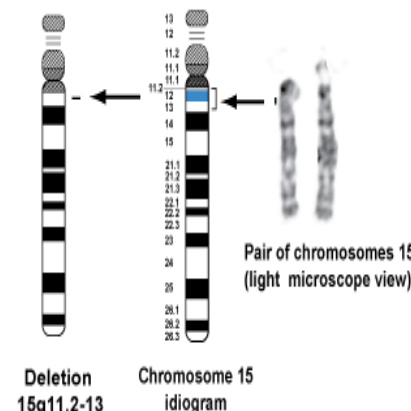


Figure 3 - New microdeletion and microduplication syndromes discovered over the last three to five years. Red squares indicate reported microdeletions and blue circles indicate reported microduplications.



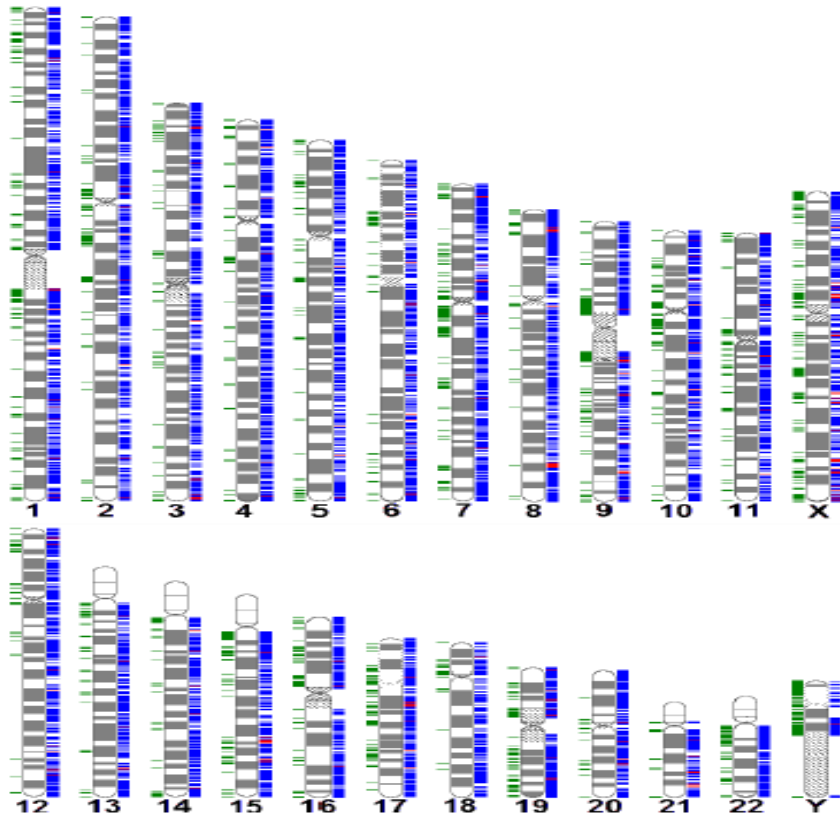
Síndrome 22q11.21

Síndrome Angelman

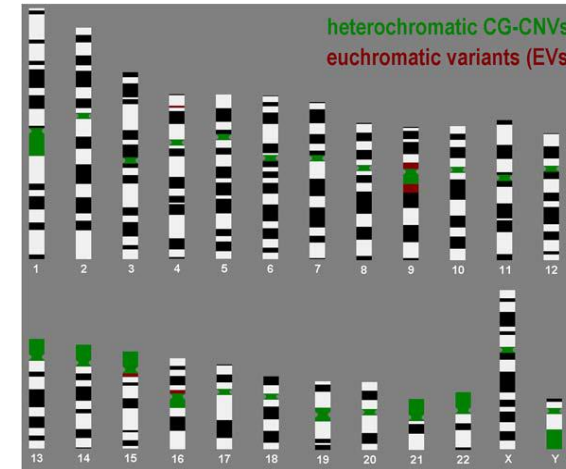


Deletion 15q11.2-13
Chromosome 15 idiogram

CNVs de la normalidad



Database of Genomic Variants, MacDonald y cols. 2014



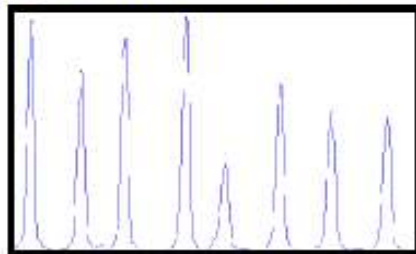
- Rearreglo de ADN que involucra a más de 50pb
 - CNVs en población general
- Contribuyen a la diversidad genómica y fenotípica humana
 - El 80% del genoma tolera variantes de copia
 - Variantes heterocromáticas/eucromáticas: regiones con copias múltiples sin efecto fenotípico aparente

Métodos de detección de CNVs



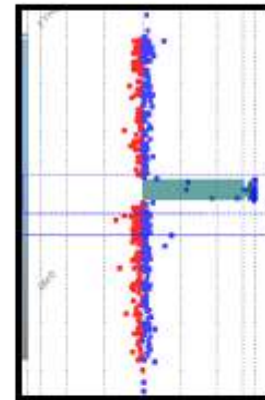
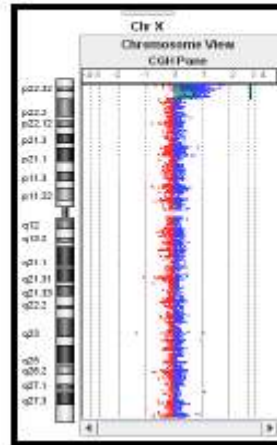
MLPA:

Resolución: 130-1 pb
Región investigada: 100 locus
(dos kits)
Tasa diagnóstica: 9-12%

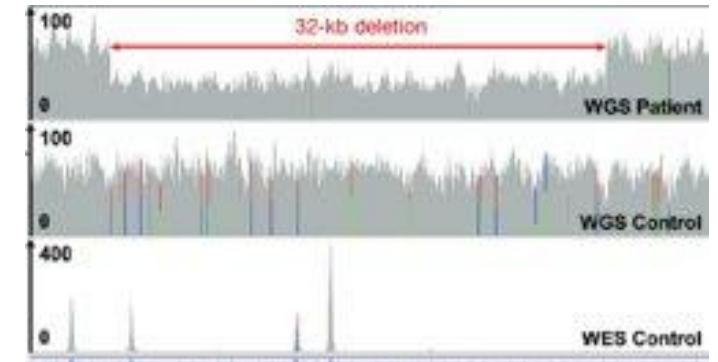


Array:

Resolución: >200 Kb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 15-20%



Whole Genome Sequencing



Citogenética:

Resolución: >6-10 Mb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 3%

Array con cobertura exónica 500 genes:

Resolución: >200 Kb- exónica
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: >20%?





Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies

David T. Miller,^{1,*} Margaret P. Adam,^{2,3} Swaroop Aradhya,⁴ Leslie G. Biesecker,⁵ Arthur R. Brothman,⁶ Nigel P. Carter,⁷ Deanna M. Church,⁸ John A. Crolla,⁹ Evan E. Eichler,¹⁰ Charles J. Epstein,¹¹

The American Journal of Human Genetics 86, 749–764, May 14, 2010



FIRST-TIER

DI/RGD

Trastorno espectro autista
Malformaciones congénitas
Talla baja
Epilepsia



REFLEX

Cromosoma marcador
Traslocación balanceada
Cariotipo alterado

33 estudios

N=21,698 pacientes

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO: 15-20%

ORIGINAL

Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio[☆]

Neus Castells-Sarret^{a,b,*}, Anna M. Cueto-González^{a,c}, Mar Borregan^c,
Fermina López-Grondona^a, Rosa Miró^b, Eduardo Tizzano^{a,d} y Alberto Plaja^{a,b}

^a Area de Genètica Clínica i Molecular, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

^c Facultat de Medicina, Departament de Ciències Morfològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

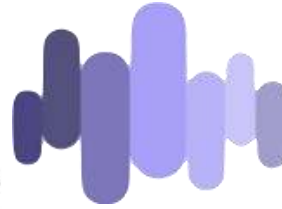
^d CIBERER, Barcelona, España



Rendimiento del 14%

- ✓ Talla baja (13,3%)
- ✓ Epilepsia (7,02%)

Clasificación



© American College of Medical Genetics and Genomics | **ACMG TECHNICAL STANDARDS** | **Genetics in Medicine**

Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)

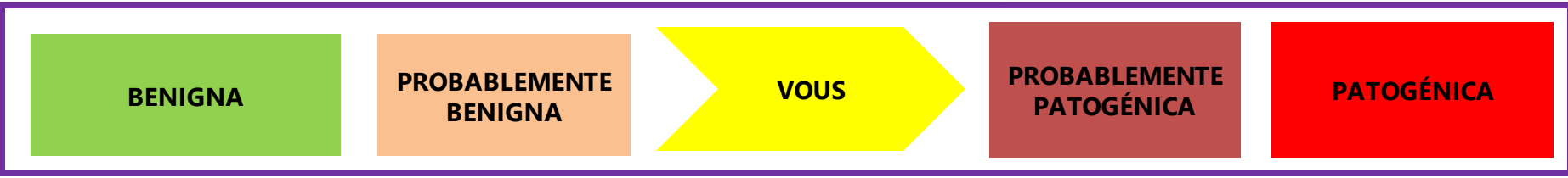
Erin Rooney Riggs, MS, CGC¹, Erica F. Andersen, PhD^{2,3}, Athena M. Cherry, PhD⁴, Sibel Kantarci, PhD⁵, Hutton Kearney, PhD⁶, Ankita Patel, PhD⁷, Gordana Raca, MD, PhD⁸, Deborah I. Ritter, PhD⁹, Sarah T. South, PhD¹⁰, Erik C. Thorland, PhD⁶, Daniel Pineda-Alvarez, MD¹¹, Swaroop Aradhya, PhD^{4,11} and Christa Lese Martin, PhD¹

ClinGen CNV Pathogenicity Calculator

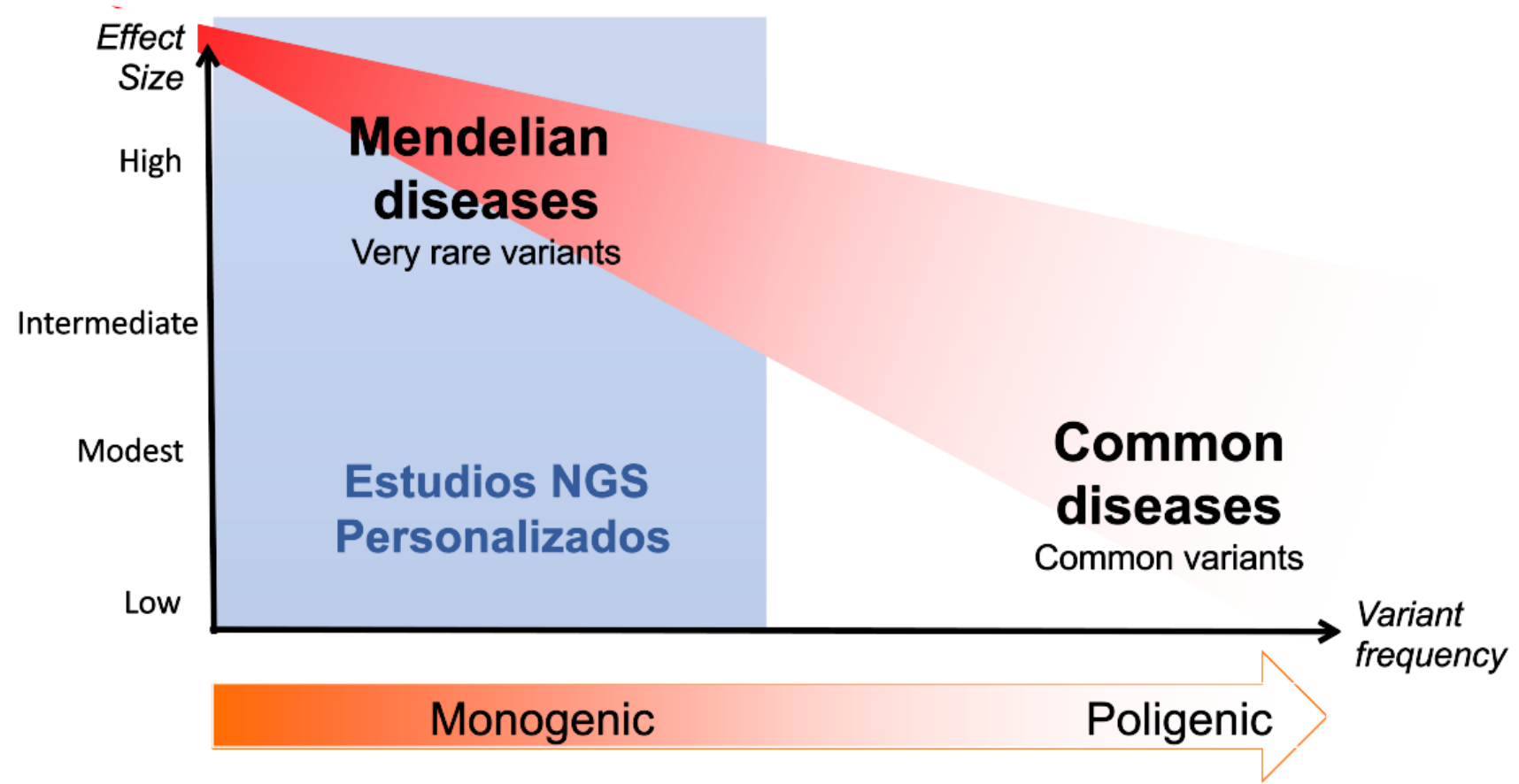
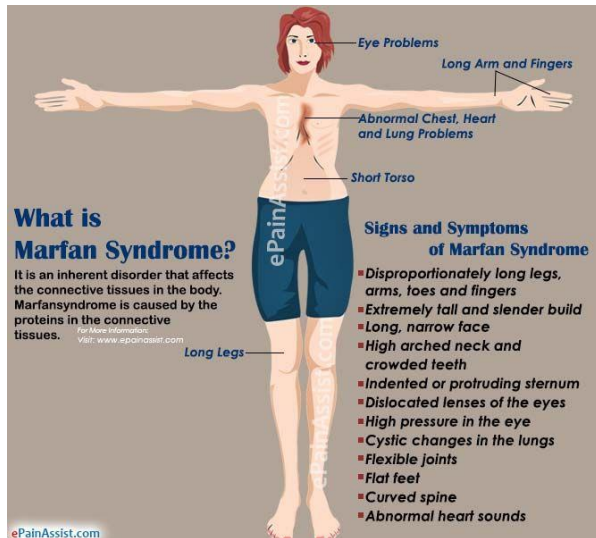
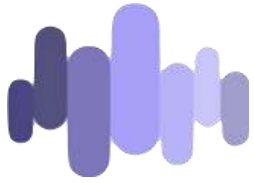
ClinGen CNV Interpretation Calculator

CNV-Loss

- CONSIDERACIONES:**
- Tamaño y naturaleza de la CNV
 - Contenido genético
 - Cercanía con síndrome conocido
 - Conocimiento de síndromes de genes contiguos
 - Presencia en bases de datos de población control



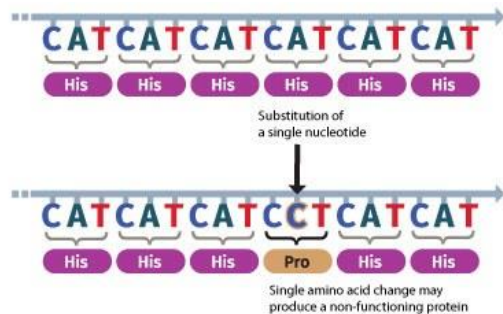
Anomalías Monogénicas



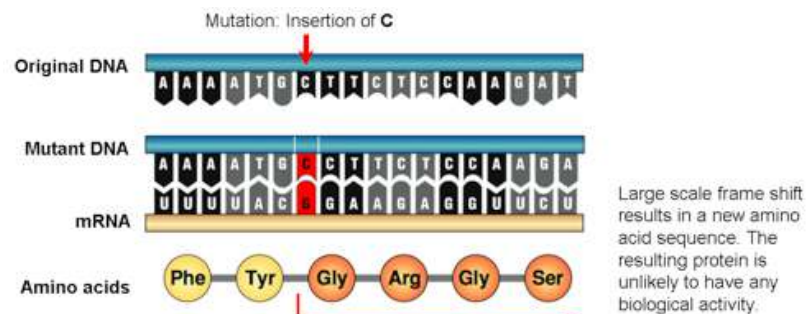
Metodologías disponibles



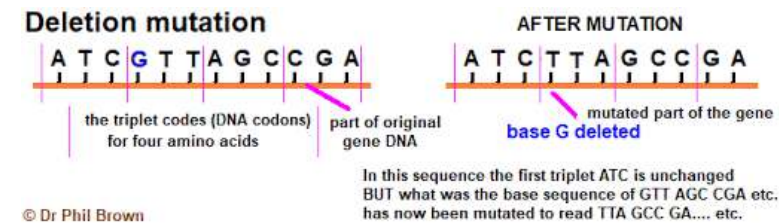
SNVs



Inserción

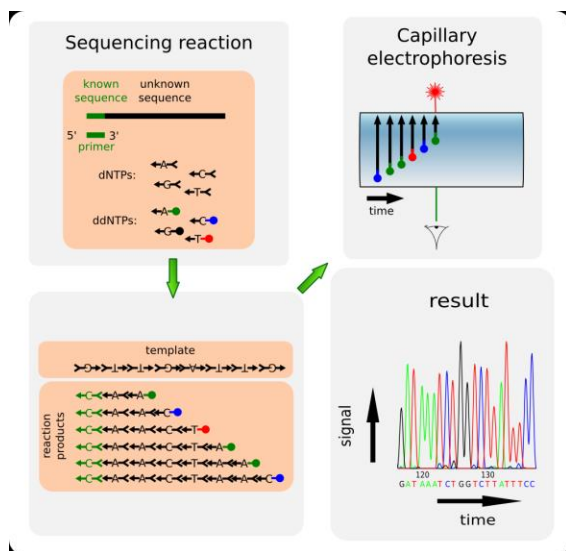


Delección

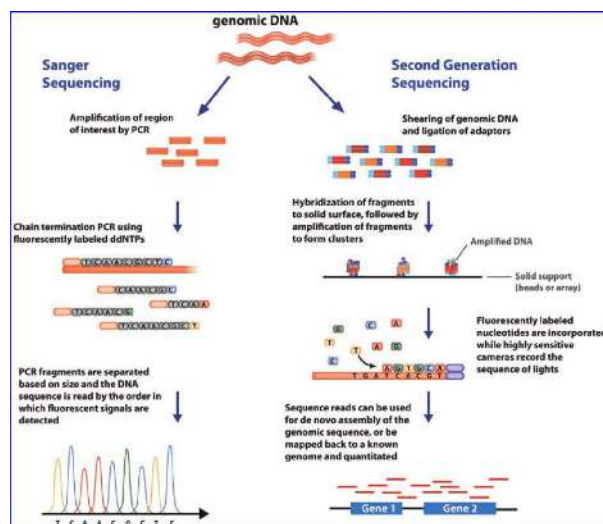


© Dr Phil Brown

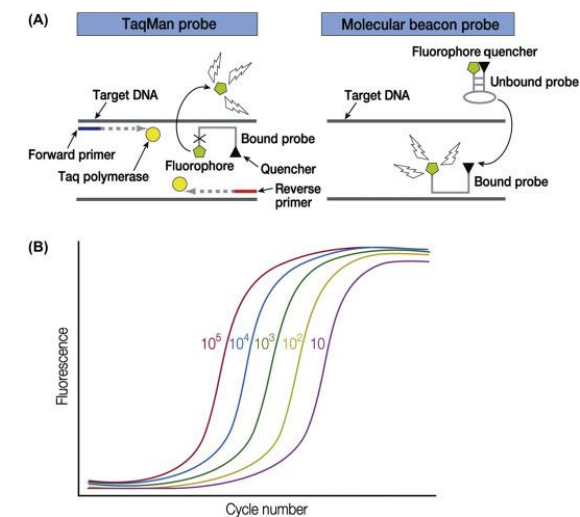
Sanger



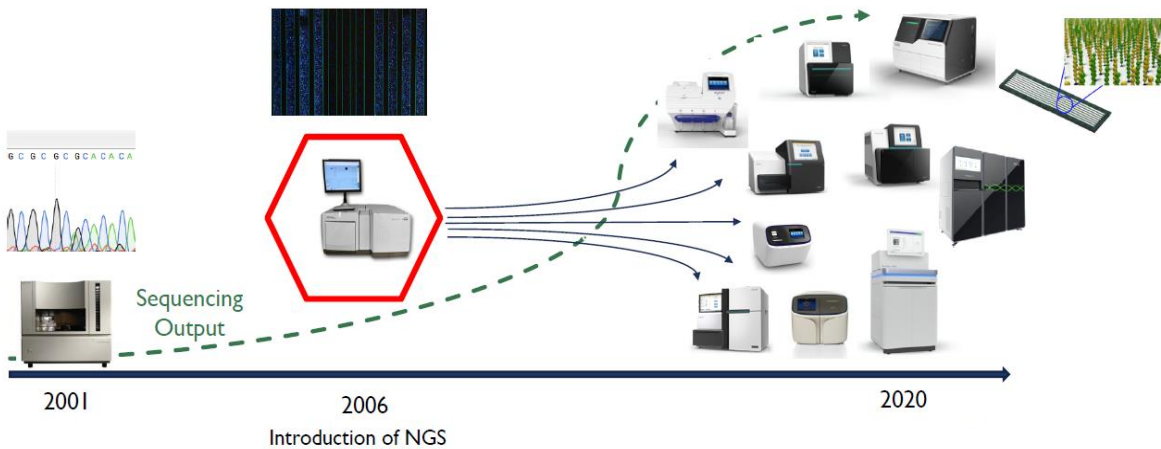
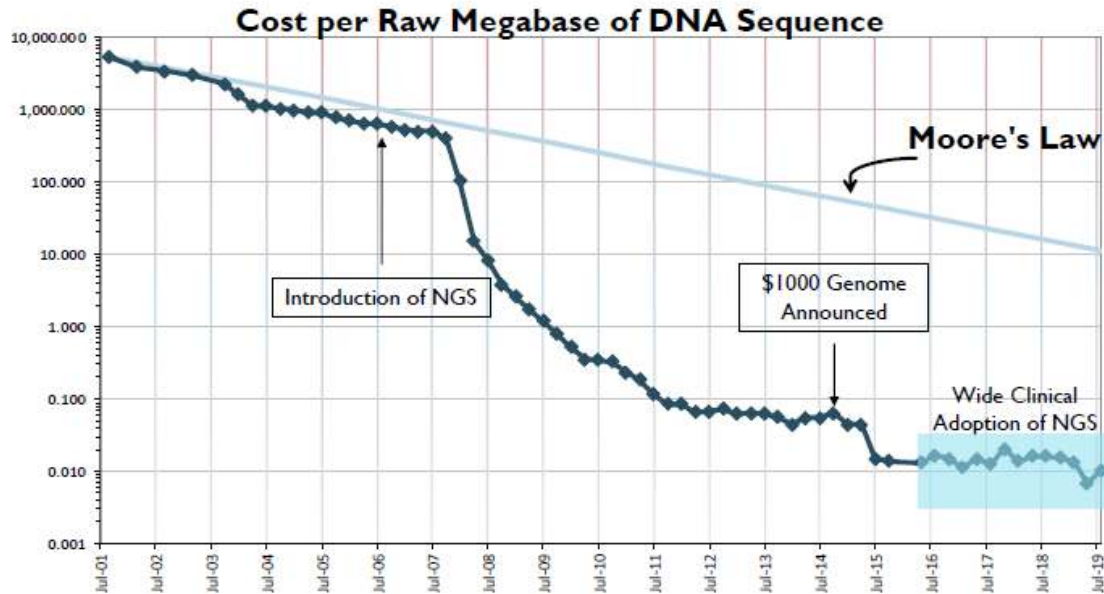
NGS



Real-Time PCR



Adopción y expansión de NGS



Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders

Oliver James Dillon^{1,2} · Sebastian Lunke¹ · Zornitza Stark^{1,2} · Alison Young¹ · Natalie Thorne³ · Melbourne Genomics Health Alliance · Clara Gall^{1,2} · Susan M. White^{1,2} · Tiong Yang Tan^{1,2}

Received: 1 September 2017 / Revised: 11 December 2017 / Accepted: 11 January 2018
 © European Society of Human Genetics 2018

Abstract

As test costs decline, whole-exome sequencing (WES) has become the primary alternative to gene panels (testing for patient diagnostic yield of singleton-WES with simulated application).

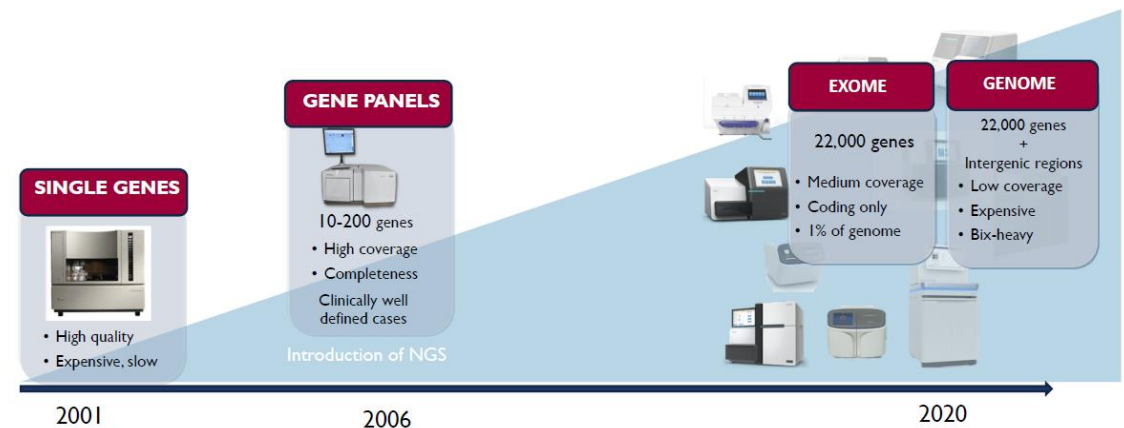
© American College of Medical Genetics and Genomics

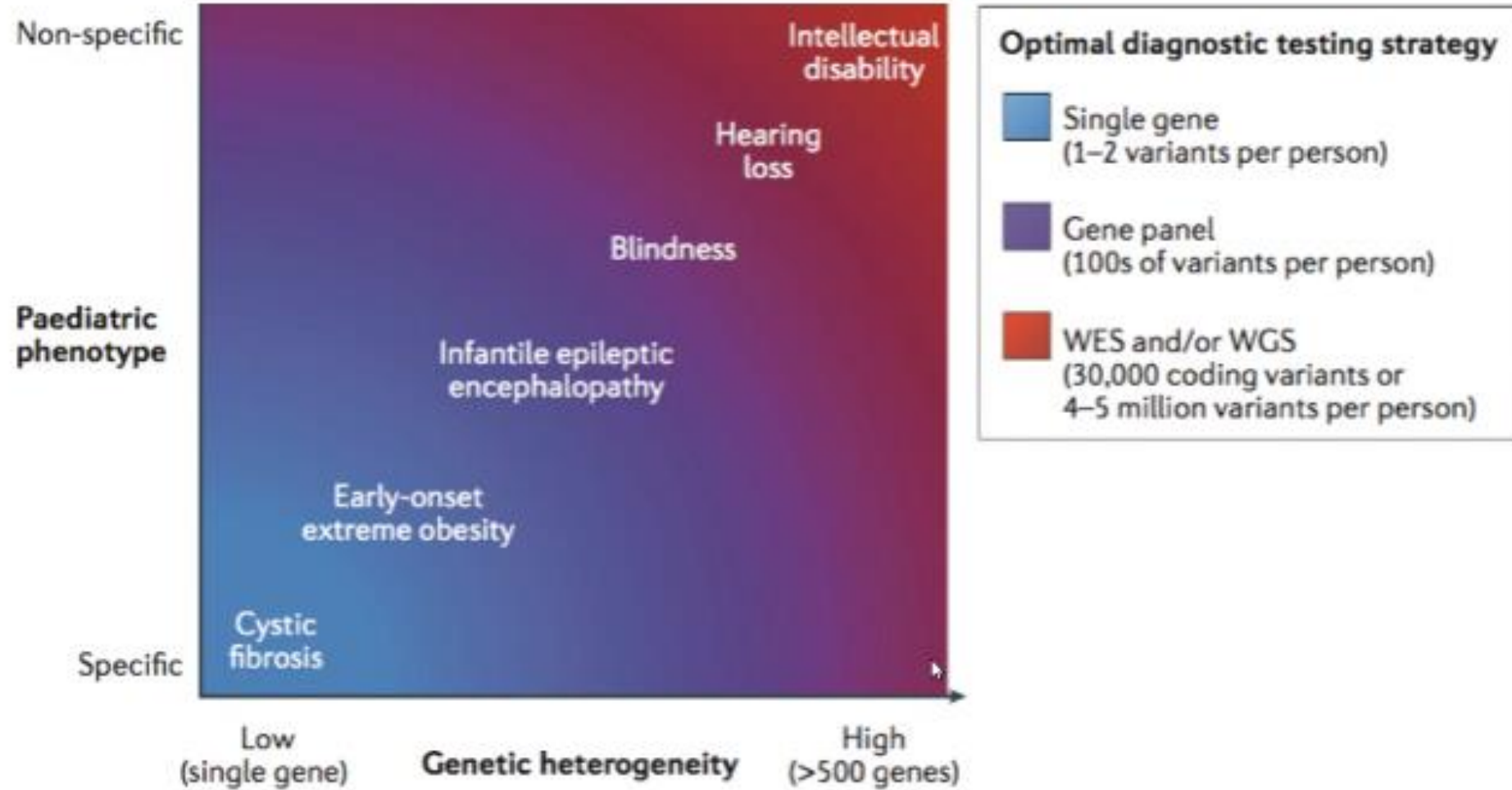
ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Genetics
in Medicine

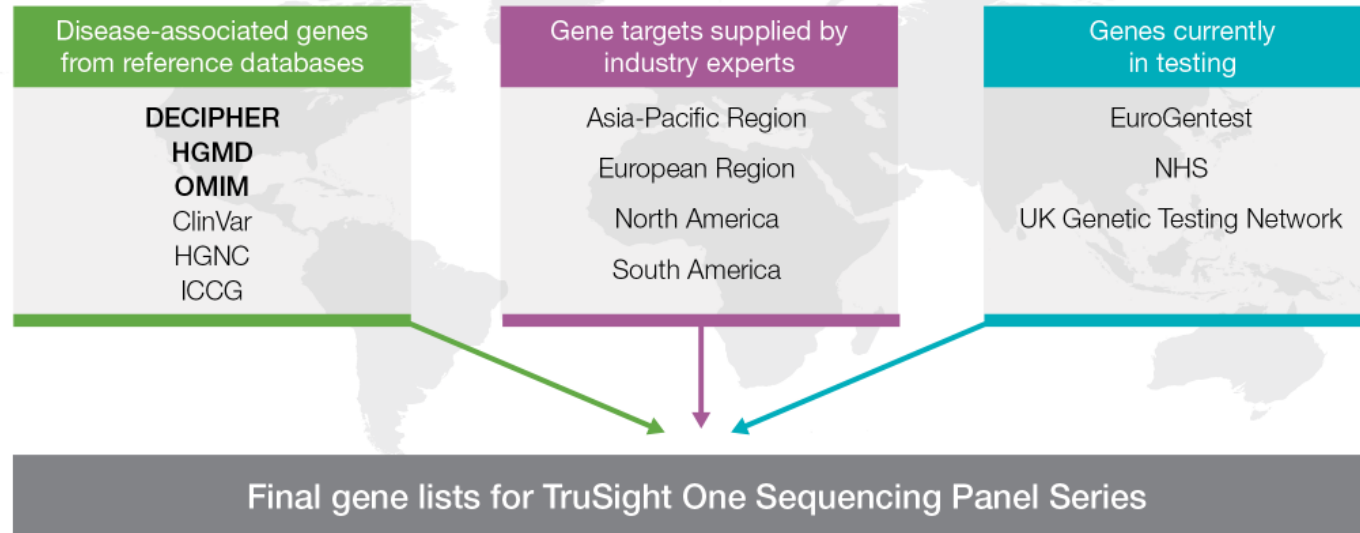
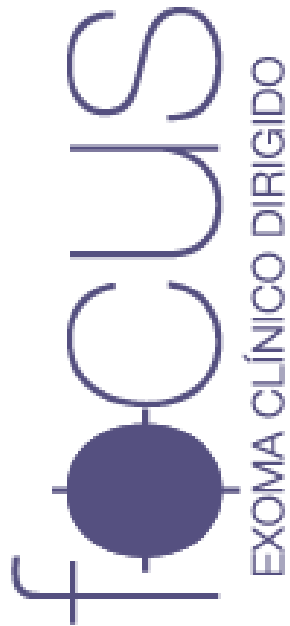
Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of rare disorders with congenital anomalies and/or intellectual disability: substantial interest of prospective annual reanalysis

Sophie Nambot, MD^{1,2,3,4}, Julien Thevenon, MD, PhD^{1,3,4}, Paul Kuentz, MD, PhD^{2,3,4}, Yannick Duffourd, MSc^{3,4}, Emilie Tisserant, PhD^{3,4}, Ange-Line Bruel, PhD^{3,4}, Anne-Laure Mosca-Boidron, MD^{2,3,4}, Alice Masurel-Paulet, MD^{1,2}, Daphné Lehalle, MD¹, Nolwenn Jean-Marçais, MD^{1,3}, Mathilde Lefebvre, MD^{1,2}, Pierre Vabres, MD, PhD^{3,4}, Salima El Chehadeh-Djebbar, MD¹, Christophe Philippe, MD, PhD^{2,4}, Frederic Tran Mau-Them, MD^{2,4}, Judith St-Onge, DEC^{2,4}, Thibaud Jouan, BSc^{2,3,4}, Martin Chevarin, HNC^{2,3,4}, Charlotte Poë, BSc^{2,3,4}, Virginie Carmignac, PhD⁴, Antonio Vitobello, PhD^{2,3,4}, Patrick Callier, MD, PhD^{2,3,4}, Jean-Baptiste Rivière, PhD^{2,3,4}, Laurence Faivre, MD, PhD^{1,3,4}, Christel Chauvin-Robinet, MD, PhD^{1,2,3,4} and Orphanomix Physicians' Group⁸





The TruSight One Expanded Sequencing Panel



Exoma clínico

Solo aquellos genes relevantes (o potencialmente) clínicamente.

**6704 genes
(86.000 exones)**

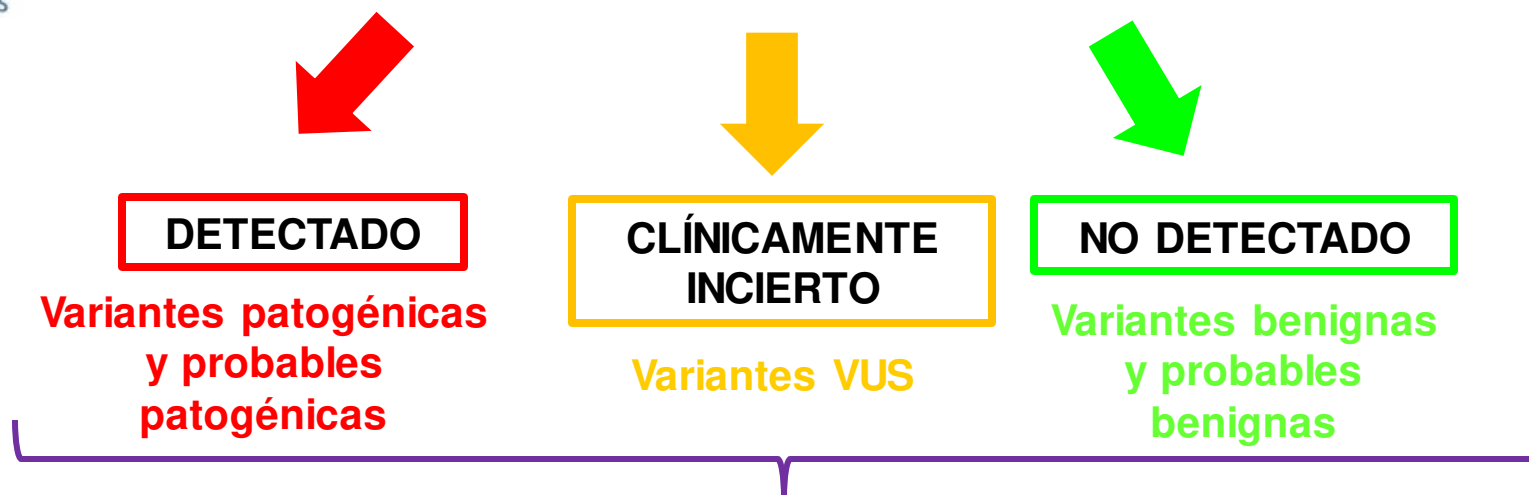
Table 1: TruSight One Sequencing Panel Specifications

Parameter	TruSight One	TruSight One Expanded
Cumulative Target Region Size		16.5 Mb
No. of Target Genes		6704
No. of Target Exons		~86,000
Probe Size		80-mer
No. of Probes		183,809
Minimum Coverage ^a		> 20
Average Coverage		> 100
a. 95% of target regions typical possible with fewer samples per run)		(higher percent coverage)

Analogía del iceberg



Resolución del caso



PRINCIPALES CRITERIOS

- Tipo de mutación
- Co-segregación familiar con la enfermedad
- Predictores in-sílico
- Historia familiar
- Estudios funcionales
- Pérdida de heterocigocidad
- Clasificación de bases de datos
- Presencia en población control



¡Muchas gracias!

guadalupe.mejico@heritas.com.ar



www.heritas.com.ar



info@heritas.com.ar



[Héritas](#)



[HeritasArg](#)