



Estratègies de diagnòstic genètic en fetus amb malformacions congènites. Correlació genotip-fenotip

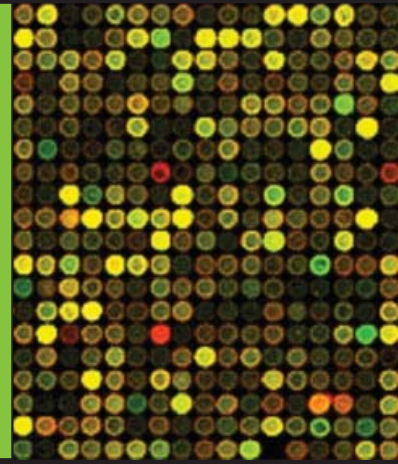
Irene Mademont Soler

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Estratègies de diagnòstic genètic en
fetus amb malformacions congènites.
Correlació genotip-fenotip.**



Irene Mademont Soler

Tesi doctoral
2013

Estratègies de diagnòstic genètic en fetus amb malformacions congènites. Correlació genotip-fenotip.

Tesi doctoral presentada per
Irene Mademont Soler
per optar al grau de Doctor en Biologia
(Programa de Doctorat en Biomedicina),
realitzada al Servei de Bioquímica i Genètica Molecular
de l'Hospital Clínic de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Aurora Sánchez Díaz,
del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona

Adscrita al Departament de Ciències Fisiològiques I de la Facultat de Medicina de
la Universitat de Barcelona, sota la tutoria del Dr. Rafael Oliva Virgili.

Dra. Aurora Sánchez Díaz

Dr. Rafael Oliva Virgili

Irene Mademont Soler

Barcelona, juny de 2013

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi no hauria estat possible sense les aportacions i el suport de molta gent. A tots ells els agraeixo enormement la seva col·laboració desinteressada.

En primer lloc, el més sincer agraïment a la Dra. Aurora Sánchez, una professional excepcional i una gran persona. Aquesta tesi no hauria estat possible sense el seu suport, dedicació i perseverança; ni tampoc sense totes les seves aportacions. “Aurora, treballar i fer ciència al teu costat ha estat un veritable privilegi, i espero que d’una manera o altra puguem seguir-ho fent”.

També agrair a la resta de companys i companyes de la Secció de Citogenètica i Genètica Clínica de l’Hospital Clínic de Barcelona haver dedicat part del seu temps a formar-me, i per acollir-me des del principi amb els braços oberts. A la Dra. Núria Clusellas, la Dra. Ester Margarit, l’Emma, en Marc, la Marian, la Sabine, l’Edu, l’Angelines, l’Àngels, la M^aJosé, la Yolanda... i d’una forma molt especial a la Dra. Anna Soler, per fer-me partícip de la seva saviesa; i a la Dra. Carme Morales, una gran companya de viatge.

Aquesta tesi també ha comptat amb la inestimable col·laboració del Prof. Joris Vermeesch i el seu equip de KU Leuven -Bèlgica-, i del Dr. Bai-Lin Wu i el seu equip del Children’s Hospital Boston -EUA-. El valor de les seves aportacions a aquesta tesi és incalculable.

També vull agrair el suport que m'han donat els meus actuals companys de feina del Centre de Genètica de Cardiovascular de Girona, i a la Dra. María Obón i la resta de professionals del Servei d'Anàlisis Clínicas de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta.

I, finalment, agrair als meus pares, a en Carles, i als meus amics tot el seu suport. Sense ells, aquesta tesi tampoc hauria estat possible. Infinites gràcies a tots!

A la meva mare.

ÍNDEX

ABREVIATURES	13
INTRODUCCIÓ	15
1. Història i evolució del diagnòstic citogenètic	17
1.1. Origen de la citogenètica humana	17
1.2. El naixement del diagnòstic citogenètic prenatal	18
1.3. Avantatges i limitacions de la citogenètica convencional	20
1.4. Introducció de la citogenètica molecular	21
2. Anomalies cromosòmiques	36
2.1. Anomalies cromosòmiques: tipus, incidència, repercussió fenotípica i diagnòstic	36
2.1.1. Anomalies cromosòmiques numèriques	37
2.1.2. Anomalies cromosòmiques estructurals	42
2.1.2.1. Anomalies cromosòmiques estructurals microscòpiques	45
2.1.2.2. Anomalies cromosòmiques estructurals críptiques	47
2.1.2.2.1. Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2	51
2.2. Anomalies cromosòmiques: origen	52
2.3. Anomalies cromosòmiques: risc de recurrència	59
3. Indicacions de procediment invasiu de diagnòstic prenatal	63

3.1. Anomalies ecogràfiques	64
3.2. Cribratge de primer o segon trimestre positiu	66
3.3. Anomalia cromosòmica parental	68
3.4. Anomalia cromosòmica prèvia	69
3.5. Altres indicacions	69
4. Etiologia de les anomalies congènites	69
4.1. Etiologia de les cardiopaties congènites	70
5. Procediments invasius per a l'obtenció del cariotip fetal	75
6. Assessorament genètic en diagnòstic prenatal	77
7. Perspectives de futur del diagnòstic citogenètic prenatal	81
HIPÒTESI	83
OBJECTIUS	87
RESULTATS	91
1. Recull dels resultats dels estudis citogenètics en líquid amniòtic realitzats entre 1998 i 2009 a l'Hospital Clínic de Barcelona.	95
2. Aplicació de la tècnica MLPA subtelomèrica en fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, i en fetus amb anomalies cromosòmiques de difícil caracterització per citogenètica convencional.	103
3. Comparació de les tècniques MLPA específica de cardiopaties i FISH de la regió 22q11.2 per al diagnòstic genètic de fetus amb malformacions cardíques.	117

4. Potencial diagnòstic de la CMA en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques.	123
DISCUSSIÓ	133
1. La citogenètica convencional en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques	136
2. Desequilibris subtelomèrics críptics en fetus amb troballes ecogràfiques i cariotip normal	140
3. Estudi de gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques	143
3.1. Anàlisi comparatiu de l'MLPA de cardiopaties i la FISH de la regió 22q11.2 per a l'estudi de gestacions amb anomalies ecogràfiques cardíaques	144
3.2. Anomalies cromosòmiques microscòpiques i críptiques en fetus amb troballes ecogràfiques cardíaques	146
4. Caracterització de reorganitzacions cromosòmiques mitjançant tècniques de citogenètica molecular	153
5. Valoració de la necessitat de canviar els protocols de diagnòstic citogenètic prenatal actuals	157
6. Perspectives de futur del diagnòstic citogenètic prenatal	161
CONCLUSIONS	169
BIBLIOGRAFIA	175

ABREVIATURES

AFP	Alfa-fetoproteïna
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CMA	<i>Chromosomal Microarray-based Analysis</i>
CNV	<i>Copy Number Variant</i>
DGP	Diagnòstic Genètic Preimplantatori
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DUP	Disomia uniparental
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
fβ-hCG	Fracció β lliure de l'hormona gonadotropina coriònica
ICSI	<i>Intracytoplasmatic Sperm Injection</i>
LCR	<i>Low Copy Repeat</i>
M-FISH	<i>Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NAHR	<i>Non-allelic Homologous Recombination</i>
PAPP-A	<i>Pregnancy-Associated Plasma Protein-A</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QF-PCR	<i>Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction</i>
RCIU	Retard de Creixement Intrauterí
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Sd	Síndrome
SKY	<i>Spectral Karyotyping</i>
SMC	<i>Supernumerary Marker Chromosome</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TN	Translucidesa Nucal
uE3	Estriol no conjugat
VPP	Valor predictiu positiu

INTRODUCCIÓ

1. Història i evolució del diagnòstic citogenètic

1.1. Origen de la citogenètica humana

Els primers cromosomes humans en mitosi es van observar a finals del segle XIX, però l'origen de la citogenètica humana moderna no va tenir lloc fins el 1956, quan es va establir que la dotació cromosòmica humana era de 46 cromosomes, i no de 48 com es creia fins llavors [Tjio and Levan, 1956; Ford and Hamerton, 1956].

Tres anys més tard, el 1959, es va demostrar la primera aplicació mèdica dels estudis citogenètics, al associar-se la trisomia del cromosoma 21 amb la Síndrome de Down [Lejeune *et al.*, 1959]. Aquell mateix any també es van descriure la Sd. de Turner (45,X) i la Sd. de Klinefelter (47,XXY), i un any més tard la Sd. de Patau (trisomia 13) i la Sd. d'Edwards (trisomia 18) [Ford *et al.*, 1959; Jacobs and Strong, 1959; Patau *et al.*, 1960; Edwards *et al.*, 1960]. Posteriorment, l'any 1963, es va descobrir la primera síndrome delecional, la Sd. de Cri-du-Chat, caracteritzada per la deleció del braç curt del cromosoma 5 [Lejeune *et al.*, 1963].

El següent gran avenç en el camp de la citogenètica va tenir lloc a principis de la dècada dels 70, quan es van desenvolupar les tècniques de bandejat de cromosomes, que permetien la identificació precisa de cada parell cromosòmic [Caspersson *et al.*, 1970; Patil *et al.*, 1971; Drets and Shaw, 1971]. Amb els anys aquestes tècniques es van perfeccionar i el poder de resolució diagnòstica del cariotip convencional va incrementar-se fins a arribar a les 5-10Mb actuals (Figura 1). La utilització d'aquestes

tècniques de bandejat va permetre la detecció de moltes anomalies cromosòmiques, tant equilibrades com desequilibrades, i en poc temps el cariotip va entrar a la pràctica clínica rutinària per a l'estudi d'individus amb retard mental i/o malformacions congènites, d'individus amb alteracions del desenvolupament sexual, i de parelles amb esterilitat/infertilitat.

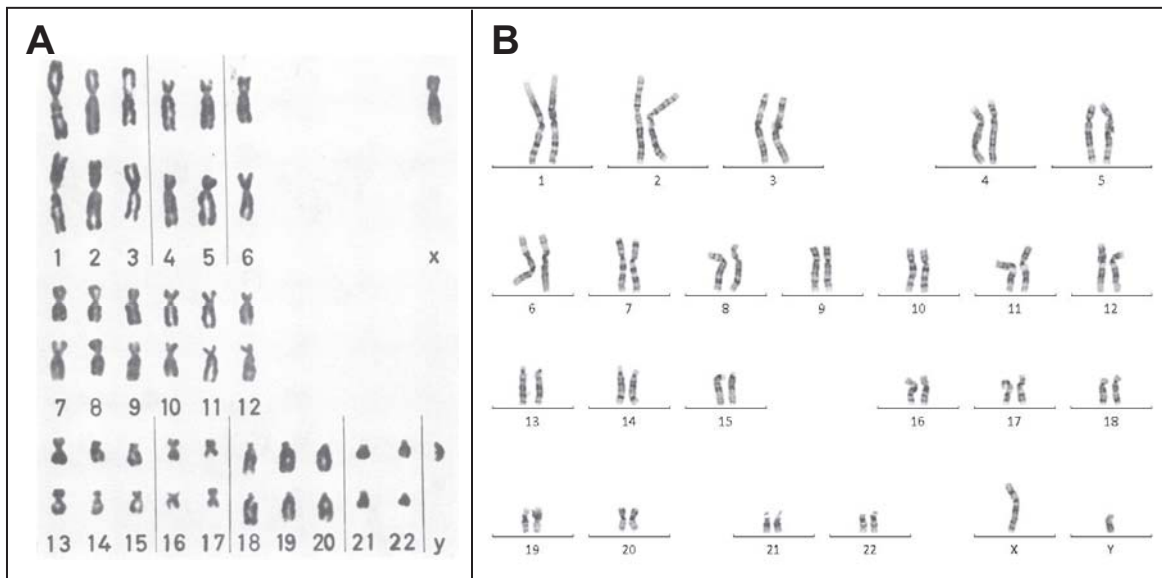


Figura 1. Evolució de la citogenètica convencional. **A.** Exemple d'un dels primers cariotips en sang perifèrica, publicat per Tijo and Puck el 1958. **B.** Cariotip en sang perifèrica actual, aplicant tècniques de bandejat cromosòmic.

El creixement exponencial del nombre d'anomalies cromosòmiques descrites va posar de manifest la necessitat d'establir una nomenclatura internacional, i així va néixer l'*International System for Human Cytogenetics Nomenclature* (ISCN), que s'actualitza i publica periòdicament des de l'any 1978.

1.2. El naixement del diagnòstic citogenètic prenatal

L'origen del diagnòstic citogenètic prenatal es situa a l'any 1966, quan Steele i Breg van demostrar la idoneïtat de les cèl·lules cultivades de

líquid amniòtic per a l'obtenció del cariotip fetal [Steele and Breg, 1966]. Un any més tard, el 1967, es va realitzar el primer diagnòstic prenatal d'una anomalia cromosòmica, una translocació equilibrada, i el 1968 es va diagnosticar el primer fetus amb trisomia 21 [Jacobson and Barter, 1967; Valenti *et al.*, 1968]. Al llarg de la dècada dels 70 el diagnòstic citogenètic en líquid amniòtic va introduir-se progressivament a la pràctica clínica (Figura 2A).

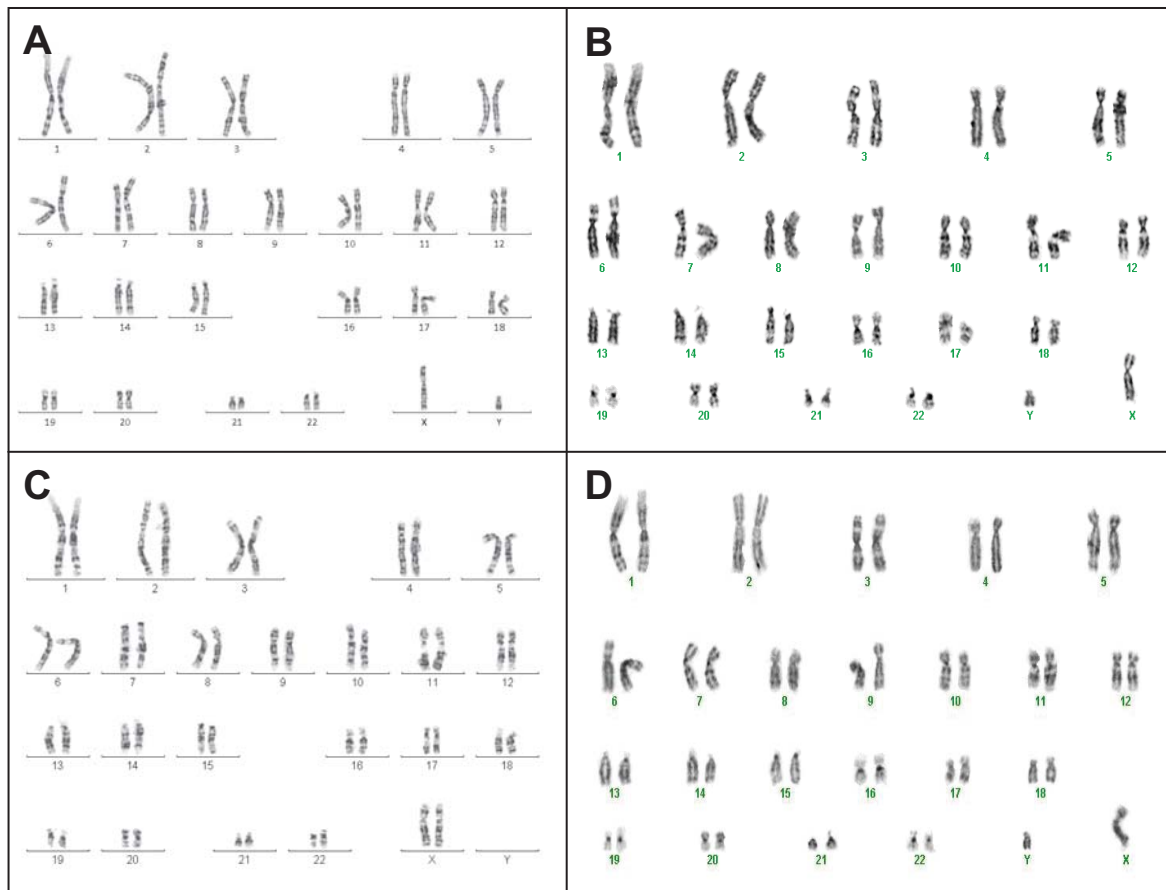


Figura 2. **A.** Cariotip normal masculí en líquid amniòtic. **B.** Cariotip normal masculí en vellositat corial, cultiu semidirecte. **C.** Cariotip normal femení en vellositat corial, cultiu llarg. **D.** Cariotip normal masculí en sang fetal.

El primer treball publicat que reporta l'ús de mostres de vellositat corial per a l'obtenció del cariotip fetal data de 1968, però les tècniques de

diagnòstic citogenètic prenatal en aquest teixit no es van introduir a la rutina obstètrica fins als anys 80 [Mohr, 1968; Simoni *et al.*, 1983]. La seva implantació va comportar un canvi important en el camp del diagnòstic prenatal, ja que oferien la possibilitat d'obtenir el cariotip fetal durant el primer trimestre de la gestació (Figura 2B i 2C). Pel que fa als estudis citogenètics en sang fetal, aquests es van començar a realitzar a la dècada dels 70 (Figura 2D) [Hobbins *et al.*, 1974].

Atès que tot procediment obstètric per a la realització d'un diagnòstic prenatal presenta un risc de pèrdua gestacional associat, ja des de l'inici de la introducció dels estudis citogenètics durant l'etapa prenatal es van establir criteris de selecció d'aquelles gestants amb un risc superior al de la població general d'anomalia cromosòmica fetal. Amb el pas del temps aquests criteris han evolucionat, oferint cada vegada una major sensibilitat i especificitat.

1.3. Avantatges i limitacions de la citogenètica convencional

El principal avantatge del cariotip convencional és que ofereix una visió global de tots els cromosomes, permetent la detecció d'anomalies cromosòmiques equilibrades i desequilibrades a una resolució limitada però que es considera acceptable (>5-10Mb). Aquestes característiques han fet que durant anys la realització del cariotip hagi estat fonamental per al diagnòstic d'anomalies cromosòmiques en individus amb retard mental i/o altres anomalies congènites d'origen desconegut, individus amb alteracions del desenvolupament sexual, parelles amb esterilitat/infertilitat, i gestacions

amb un risc incrementat d'anomalia cromosòmica fetal. En l'actualitat, el cariotip segueix sent el *gold standard* per al diagnòstic de la majoria d'aquests pacients, sent l'única excepció l'estudi de les anomalies congènites d'etiologia desconeguda durant l'etapa postnatal, per a les quals es recomana l'anàlisi cromosòmica basada en microarray com a tècnica de primera elecció [Miller *et al.*, 2010].

Entre les limitacions de la citogenètica convencional cal destacar que no permet el diagnòstic de reorganitzacions cromosòmiques submicroscòpiques o críptiques (<5-10Mb), requereix cèl·lules en divisió (i, per tant, cultiu cel·lular), poden passar desapercibuts mosaics baixos (<14%), i és una tècnica laboriosa que requereix professionals amb àmplia experiència [Hook, 1977; Soler *et al.*, 2009; Vermeesch *et al.*, 2012].

1.4. Introducció de la citogenètica molecular

Després de l'obtenció de cromosomes en metafase i de la introducció del bandejat cromosòmic, el tercer gran avenç en el camp de la citogenètica va arribar a la dècada dels 80 amb el desenvolupament de les tècniques de citogenètica molecular. La primera d'aquestes tècniques va ser la **Hibridació *In Situ* Fluorescent** (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH), que es basa en la utilització de sondes de DNA marcades fluorescentment que hibriden sobre regions concretes del genoma, ja sigui sobre cromosomes en metafase o nuclis en interfase [Pinkel *et al.*, 1986]. La FISH permet el diagnòstic d'anomalies cromosòmiques estructurals (principalment delecions) a les regions estudiades a una resolució molt

superior a la del cariotip, i també facilita la caracterització de reorganitzacions cromosòmiques (tant equilibrades com desequilibrades) i cromosomes marcadors (Figura 3).

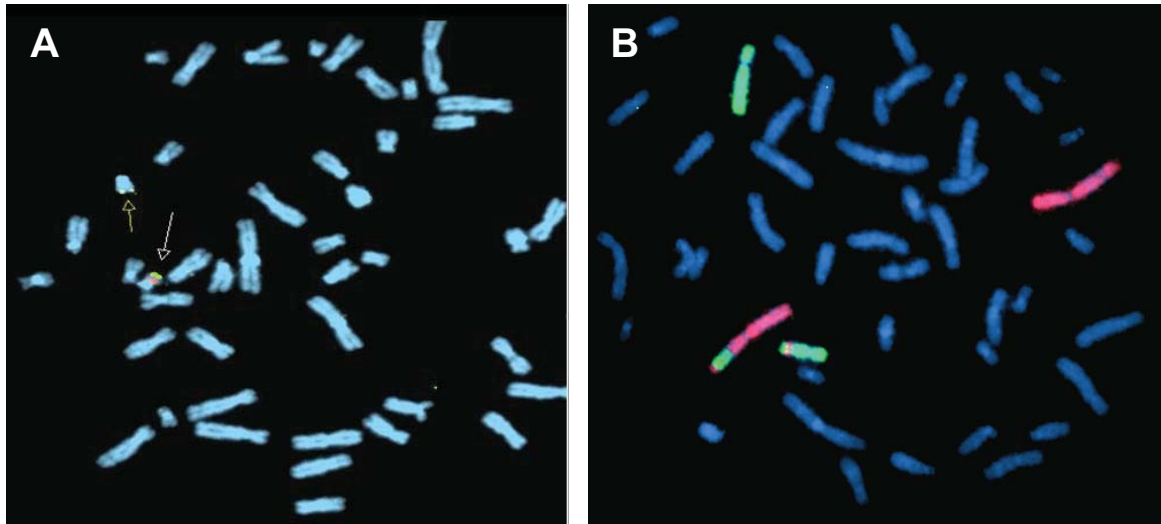


Figura 3. A. Imatge de FISH d'un pacient amb Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 en què s'ha utilitzat una sonda *locus* específica d'aquesta regió (en vermell; la senyal verda és una sonda control). **B.** Imatge de FISH d'una inserció recíproca entre els cromosomes 2 i 5 en què s'han utilitzant sondes de pintat cromosòmic d'aquests cromosomes.

Es poden dissenyar sondes de FISH per a qualsevol regió del genoma, però les més àmpliament utilitzades són les sondes comercials, especialment les *locus* específiques, dirigides a estudiar aquelles regions del genoma associades a síndromes microdelecionals concretes (Fig. 3A); les subtelo mèriques i de pintat cromosòmic, que faciliten la caracterització d'anomalies cromosòmiques estructurals (Fig. 3B); i les centromèriques, per a l'estudi de cromosomes marcadors. La FISH amb sondes centromèriques també ha estat àmpliament utilitzada en diagnòstic prenatal per a l'estudi ràpid de les aneuploidies clàssiques en nuclis en interfase;

però en l'actualitat la majoria de centres utilitzen la tècnica *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* amb aquesta finalitat (descrita a continuació).

Les principals limitacions de la FISH són que es tracta d'una tècnica dirigida a l'estudi de regions del genoma prèviament seleccionades, generalment resulta impossible diagnosticar duplicacions en tàndem, i el nombre de *loci* que es poden estudiar en un mateix experiment és limitat (generalment 2 o 3) [Soler *et al.*, 2009]. No obstant, durant molts anys la utilització de sondes de FISH subtelomèriques va ser clau per a l'estudi d'individus amb retard mental i/o malformacions congènites, ja que se sabia que aquestes regions són molt riques en gens i estan freqüentment involucrades en reorganitzacions cromosòmiques. En l'actualitat, però, altres tècniques moleculars (com la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* i l'anàlisi cromosòmica basada en microarray, descrites a continuació) han substituït la FISH per a l'estudi d'aquests pacients.

En relació a la ***Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*** (QF-PCR), actualment aquest és el mètode més utilitzat a Europa per al cribratge prenatal de les aneuploïdies més comunes (trisomies 21, 18 i 13; i dels cromosomes sexuals) [Faas *et al.*, 2011]. Aquesta tècnica, basada en l'estudi de microsatèl·lits, presenta una eficàcia i fiabilitat molt elevades, és automatitzable i econòmica. La QF-PCR té una presència important en diagnòstic prenatal, especialment en líquid amniòtic, ja que permet proporcionar un resultat en 24 hores, reduint

l'ansietat de les gestants en l'espera del resultat del cariotip (3 setmanes). També és de gran utilitat per a l'estudi de mostres en què ha fallat el cultiu, de mostres amb contaminació materna, i per determinar la zigositat en gestacions gemel·lars. La gran limitació de la QF-PCR, però, és la parcialitat dels resultats obtinguts. Únicament permet el diagnòstic de les aneuploïdies més comunes, de manera que la resta d'aneuploïdies i les reorganitzacions cromosòmiques estructurals no es poden detectar. A més, la QF-PCR tampoc és capaç de distingir si les trisomies són lliures o per reorganització cromosòmica estructural, una informació de gran rellevància per a l'assessorament genètic; i generalment no permet diagnosticar mosaics inferiors al 20% [Faas *et al.*, 2011]. Malgrat aquestes limitacions i que el cariotip es considera el *gold standard* per al diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques, alguns països (com Anglaterra, Suècia i Dinamarca) estan promovent l'ús de la QF-PCR com a tècnica única en gestacions amb un risc incrementat de trisomia i sense anomalies ecogràfiques, dins d'una estratègia d'abaratiment de la despesa en sanitat.

Amb posterioritat al desenvolupament de la FISH, i amb l'objectiu de cobrir tot el genoma, es van desenvolupar noves tècniques basades en la FISH, com l'**Spectral Karyotyping** (SKY), la **Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization** (M-FISH), i la **Hibridació Genòmica Comparada** (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH). Les dues primeres permeten la visualització simultània de tots els cromosomes en diferents colors, facilitant la visualització de reorganitzacions cromosòmiques estructurals;

mentre que la CGH es basa en la cohibridació d'un DNA problema i un DNA control sobre cromosomes normals en metafase, amb l'objectiu de detectar desequilibris cromosòmics al llarg de tot el genoma (Figura 4) [Kallioniemi *et al.*, 1992; Speicher *et al.*, 1996; Liyange *et al.*, 1996]. Totes aquestes tècniques són àmpliament utilitzades en citogenètica del càncer per identificar i caracteritzar reorganitzacions cromosòmiques complexes, però tenint en compte que no ofereixen un poder de resolució molt superior al de la citogenètica convencional i són laborioses, no s'han implantat en el camp del diagnòstic citogenètic constitucional.

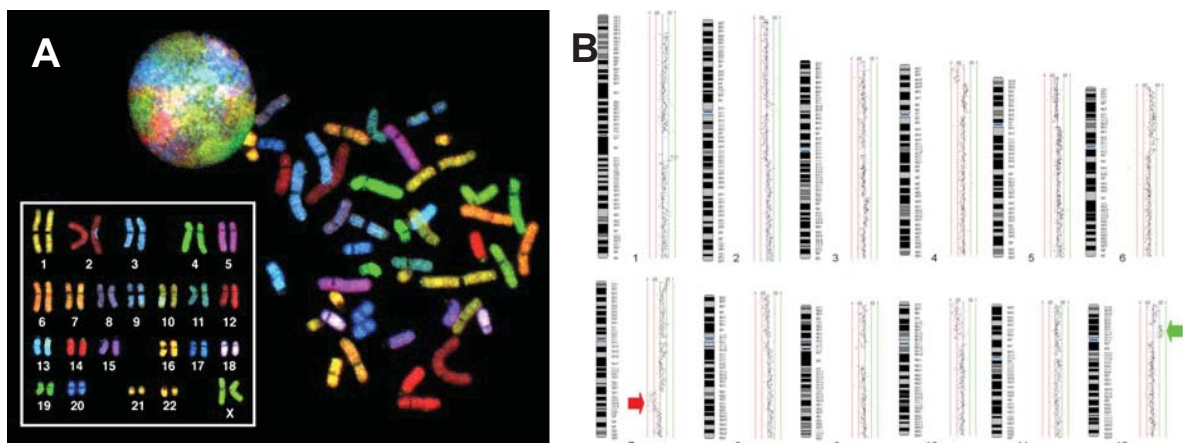


Figura 4. A. Imatge d'SKY. B. Resultat parcial (del cromosoma 1 al 12) d'un estudi de CGH.

A finals de la dècada dels 90 es va desenvolupar la tècnica ***Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*** (MLPA), que permet la detecció d'alteracions en nombre de còpia en múltiples regions del genoma prèviament seleccionades (fins a 50) en un únic experiment. La tècnica es basa en l'amplificació dels *loci* diana mitjançant una PCR multiplex, la seva anàlisi per electroforesi capil·lar, i la posterior comparació del patró de pics

obtingut per la mostra problema respecte a mostres de referència (Figura 5). L'MLPA generalment s'utilitza per a l'estudi de DNA genòmic, però en l'actualitat també es poden quantificar seqüències d'RNA i determinar perfils de metilació mitjançant aquesta tecnologia.

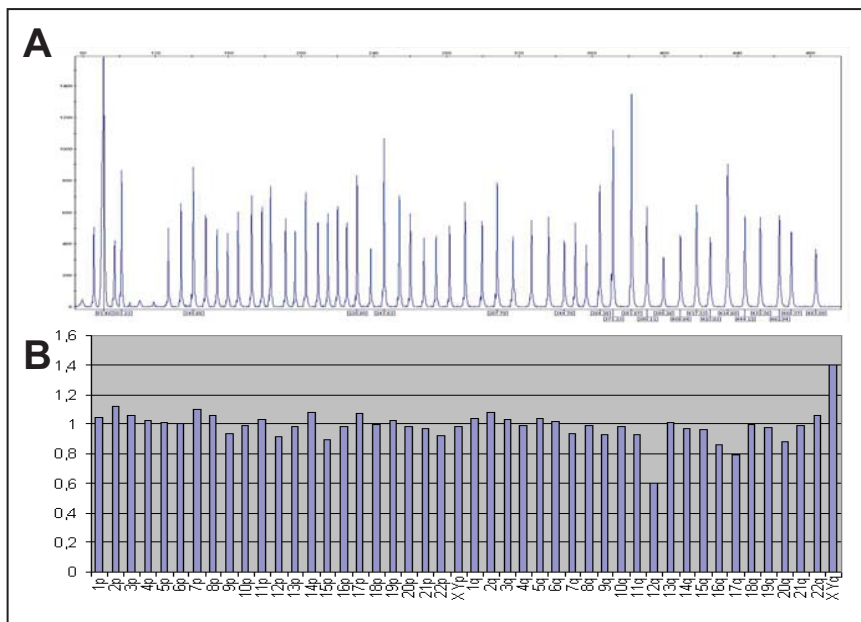


Figura 5. Resultat de l'estudi d'MLPA subtelmèrica d'un fetus amb una translocació desequilibrada entre els cromosomes Y i 12. **A.** Perfil de separació dels productes amplificats per MLPA obtingut mitjançant electroforesis capil·lar. **B.** Comparació dels resultats obtinguts per la mostra problema respecte a mostres control, on es pot apreciar una trisomia X/Yqter i monosomia 12qter.

Els principals avantatges de l'MLPA són l'elevada resolució (molt superior al cariotip en les regions estudiades), i que és un mètode automatitzable, ràpid i econòmic. Entre les seves limitacions, cal destacar que únicament permet l'estudi de les regions preseleccionades, no detecta reorganitzacions cromosòmiques equilibrades, requereix una bona concentració i qualitat de DNA, i, depenent del tipus de teixit a estudiar, es requereix cultiu cel·lular [Van Opstal *et al.*, 2009; Armengol *et al.*, 2011].

Existeix la possibilitat de dissenyar-se *kits* d'MLPA propis, però els més àmpliament utilitzats són els comercials, dels quals n'existeix una àmplia varietat. Els més freqüentment usats per al diagnòstic d'anomalies cromosòmiques constitucionals són els d'estudi de les regions subtelomèriques, i els de síndromes microdelecionals i microduplicacionals. L'MLPA també es pot utilitzar com a tècnica ràpida per al diagnòstic prenatal d'aneuploïdies. No obstant, no s'acostuma a usar amb aquesta finalitat, ja que no permet la detecció de contaminació materna, el diagnòstic de fetus femenins triploides (els masculins poden sospitar-se), ni la detecció de mosaics inferiors al 20-30% [Faas *et al.*, 2011; Willis *et al.*, 2012].

Sens dubte, però, les tècniques de citogenètica molecular que s'han optimitzat i popularitzat més durant els darrers anys han estat les d'**anàlisi cromosòmica basada en microarray** (*Chromosomal Microarray-based Analysis*, CMA), ja que permeten la detecció de variants en nombre de còpia (*copy number variants*, CNVs) al llarg de tot el genoma a una resolució molt superior a la del cariotip, són automatitzables i no requereixen cultiu cel·lular (Figura 6). Es consideren CNVs totes aquelles alteracions genòmiques estructurals de mida igual o superior a 1Kb que comporten guany o pèrdua de material genètic [Zhang *et al.*, 2006]. Actualment s'han descrit més de 65.000 CNVs en població control sana [Database of Genomic Variants], i es pensa que contribueixen de forma important a la variació fenotípica de la població general [lafrate *et al.*, 2004;

Freeman *et al.*, 2006; Goidts *et al.*, 2006]. Si bé la majoria de CNVs són benignes, altres són patogèniques i s'associen a anomalies fenotípiques. Generalment, les CNVs es poden classificar en una d'aquestes dues categories, però en alguns casos es detecten variants en nombre de còpia de significat clínic incert (*variants of uncertain clinical significance, VOUS*), per les quals és impossible predir l'efecte fenotípic amb la informació disponible actualment.

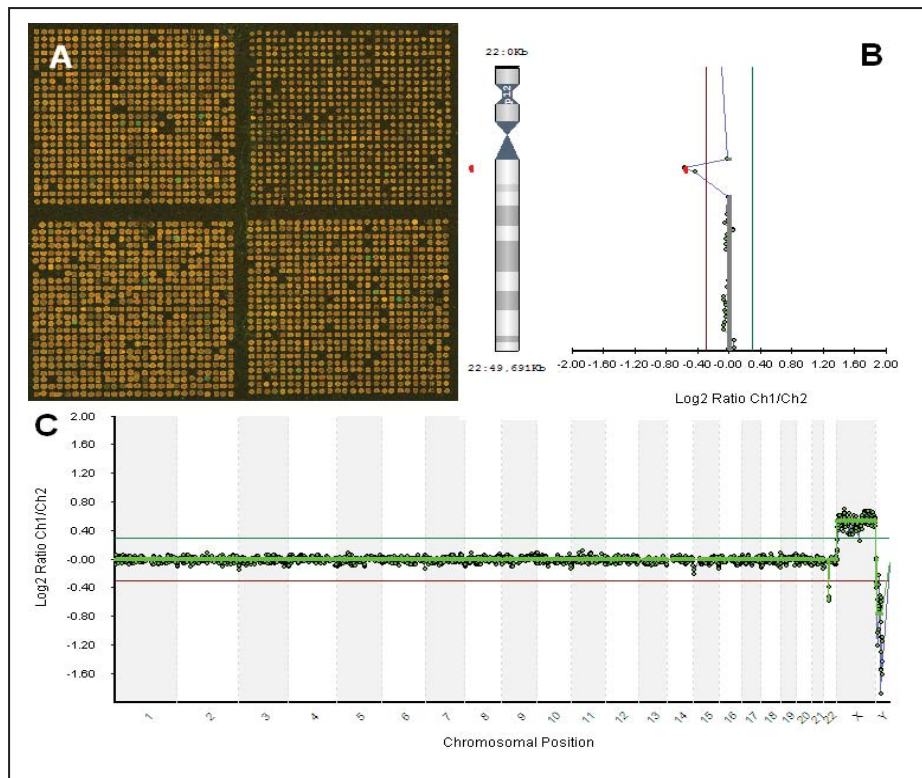


Figura 6. Estudi mitjançant CMA d'un fetus amb la microdeleció típica de la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2. **A.** Imatge de la hibridació sobre el microarray dels DNAs problema i control, marcats amb els fluorocroms Cy5 i Cy3, respectivament. **B.** Resultat de l'array pel cromosoma 22. **C.** Perfil de CNVs observades al llarg de tot el genoma d'aquest fetus (respecte a un DNA de referència de sexe oposat).

La detecció de VOUS és la principal limitació de les tècniques de CMA, però també cal tenir present que mitjançant aquesta tecnologia no es poden diagnosticar reorganitzacions cromosòmiques equilibrades ni alguns cromosomes marcadors, són difícils de diagnosticar els mosaics inferiors al 20-30%, algunes plataformes no permeten el diagnòstic de poliploïdies, no s'obté informació geogràfica de l'anomalia diagnosticada, i en l'actualitat el seu cost encara és superior al del cariotip convencional [Rickman *et al.*, 2006; Ballif *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2010; Bui *et al.*, 2011; Zuffardi *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2012; Lars, 2012; Vermeesch *et al.*, 2012].

Les tècniques de CMA van ser descrites per primera vegada per Solinas-Toldo *et al.* l'any 1997, amb l'objectiu d'identificar gens involucrats en la patogènesi del càncer mitjançant la detecció de CNVs en tumors [Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Liehr, 2009b]; però aquesta metodologia ràpidament es va optimitzar i aplicar per a la detecció de reorganitzacions cromosòmiques constitucionals en desequilibri en individus amb anomalies congènites. La utilització de plataformes de CMA en aquests pacients ha resultat en una acceleració sense precedents en el descobriment de les causes de desordres genètics esporàdics, la descripció de noves síndromes microdelecionals i microduplicacionals (i una millor caracterització de les ja conegudes), i el descobriment de gens associats a anomalies congènites aïllades [Strassberg *et al.*, 2011].

En l'actualitat, nombrosos estudis han demostrat que les plataformes de CMA ofereixen un potencial diagnòstic molt superior al del cariotip convencional en pacients amb retard del desenvolupament, desordres de l'espectre autista i/o anomalies congènites múltiples d'origen desconegut (15-20% *versus* 3%, si s'exclouen la Síndrome de Down i altres síndromes cromosòmiques clínicament diagnosticables) [Miller *et al.*, 2010]. D'acord amb aquests resultats, recentment s'han introduït canvis en els protocols de diagnòstic d'aquests pacients, i la CMA es recomana com a tècnica de primera elecció per al seu estudi [Miller *et al.*, 2010].

En diagnòstic prenatal, el paper que han de tenir les plataformes de CMA encara és motiu de debat. En funció de l'estudi, la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants varia significativament, concretament entre el 0% i el 28,9% (Taula 1). Entre les causes d'aquestes diferències cal destacar els següents factors: i) grans diferències en les mides de les cohorts; ii) diferents proporcions de cada indicació de procediment invasiu (alguns estudis les inclouen totes, mentre que d'altres únicament avaluen una indicació específica, p.e. anomalies ecogràfiques fetals); iii) alguns treballs únicament analitzen gestacions amb cariotip normal, i d'altres també inclouen aquelles anomalies diagnosticades per citogenètica convencional; iv) la majoria d'estudis utilitzen plataformes de microarray de diferents característiques i nivells de resolució; i v) divergència quant als criteris d'interpretació de resultats.

Taula 1. Taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants reportada en els diferents estudis publicats en què s'utilitza CMA en diagnòstic prenatal, diferenciant els resultats per al conjunt d'indicacions de procediment invasiu i per a aquelles gestacions referides per anomalies ecogràfiques.

Estudi	N	% d'anomalies cromosòmiques detectades per CMA	
		conj. d'ind.	an. eco.
Le Caignec <i>et al.</i> , 2005	49	-	8,2%
Sahoo <i>et al.</i> , 2006	98	5,1%	-
Shaffer <i>et al.</i> , 2008 ^a	151	1,3%	1,8%
Vialard <i>et al.</i> , 2009	39	-	12,8%
Coppinger <i>et al.</i> , 2009 ^a	244	2,9%	-
Kleeman <i>et al.</i> , 2009	50	-	2%
Van der Veyver <i>et al.</i> , 2009 ^b	300	5%	-
Tyreman <i>et al.</i> , 2009	106	-	10,4%
Evangelidou <i>et al.</i> , 2010	25	8%	-
Faas <i>et al.</i> , 2010	38	-	28,9%
Maya <i>et al.</i> , 2010	269	2,6%	2%
Valduga <i>et al.</i> , 2010	50	-	10%
Srebniak <i>et al.</i> , 2011	61	-	6,6%
Florentino <i>et al.</i> , 2011	1.037	3,3%	-
Leung <i>et al.</i> , 2011	48	-	8,3%
Park <i>et al.</i> , 2011	4.073	1,8%	-
Faas <i>et al.</i> , 2012	118	-	5,1%
Armengol <i>et al.</i> , 2012	906	6,2%	12,7%
Lee <i>et al.</i> , 2012	3.171	2,7%	17%
Gruchy <i>et al.</i> , 2012	38	-	7,9%
D'Amours <i>et al.</i> , 2012	49	-	8,2%
Filges <i>et al.</i> , 2012	100	0%	-
Breman <i>et al.</i> , 2012 ^b	1.075	4,2%	8,8%
Srebniak <i>et al.</i> , 2012	207	-	11,6%
Shaffer <i>et al.</i> , 2012a i 2012b ^a	5.003	5,3%	6,5%
Wapner <i>et al.</i> , 2012	4.406	11,6%	-

^a Els estudis de Shaffer *et al.* (2012a i 2012b) inclouen els resultats dels treballs de Shaffer *et al.* (2008) i Coppinger *et al.* (2009).

^b L'estudi de Breman *et al.* (2012) inclou els resultats del treball de Van der Veyver *et al.* (2009).

No obstant, la majoria de publicacions coincideixen en que les plataformes de CMA s'haurien d'oferir com a complement al cariotip en aquelles gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, ja que en aquests casos s'incrementaria de forma significativa el diagnòstic d'alteracions cromosòmiques. D'acord amb els resultats obtinguts en les sèries publicades més extenses que avaluen la utilitat de la CMA en gestacions d'aquestes característiques, aquest increment seria del 1,8-10,4% (Taula 2) [Tyreman *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010; Armengol *et al.*, 2012; Faas *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012b; Wapner *et al.*, 2012].

Taula 2. Taxes de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants per CMA reportades en les sèries més extenses que inclouen gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal.

Estudi	Taxa de detecció de CNVs en gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal
Tyreman <i>et al.</i> , 2009	10,4% (11/106)
Maya <i>et al.</i> , 2010	2% (2/102)
Armengol <i>et al.</i> , 2012	3,8% (6/157)
Faas <i>et al.</i> , 2012	1,8% (2/114)
Shaffer <i>et al.</i> , 2012b ^a	6,2% (128/2052)
Wapner <i>et al.</i> , 2012	6% (45/755)

^a L'estudi de Shaffer *et al.* (2012b) inclou el treball de Shaffer *et al.* (2008).

Per a la resta d'indicacions clíniques de diagnòstic prenatal, la necessitat de realitzar estudis de microarray és motiu de debat; i la detecció de VOUS es considera una de les principals limitacions per a la seva utilització. En les sèries publicades amb cohorts més àmplies, la taxa de detecció de VOUS varia entre el 0% i el 4,2% [Fiorentino *et al.*, 2011;

Armengol *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Breman *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a; Wapner *et al.*, 2012]. En diagnòstic prenatal, també suposen un problema la detecció de CNVs patogèniques de penetrància incompleta i/o expressivitat variable, i de CNVs patogèniques però relacionades amb malalties d'aparició tardana, infertilitat, i predisposició a malalties neurològiques o a càncer [Zuffardi *et al.*, 2011]. Totes elles incrementen la complexitat de l'assessorament genètic, i es tradueixen directament en ansietat parental (sobretot en aquelles gestacions en què no s'observen anomalies ecogràfiques), i poden portar a la interrupció de gestacions sanes.

És important remarcar que s'espera que en els pròxims anys la proporció de VOUS detectades disminueixi significativament, gràcies a l'actualització constant de bases de dades *on line* que reporten CNVs patogèniques i benignes; les principals de les quals són: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER); *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations* (ECARUCA); *International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* (ISCA); i *Database of Genomic Variants* (DGV). També amb la finalitat d'ajudar en la interpretació de les VOUS, varis grups han publicat criteris per tal de subclassificar-les en probablement patogèniques i probablement benignes [Miller *et al.*, 2010; Vermeesch *et al.*, 2012; de Leeuw *et al.* 2012].

D'altra banda, les tècniques de CMA han demostrat ser de gran utilitat i eficàcia per caracteritzar cromosomes marcadors i anomalies cromosòmiques estructurals, tant desequilibrades com aparentment equilibrades per citogenètica convencional. Els estudis de CMA permeten determinar si existeix guany i/o pèrdua de material genètic i acotar la regió en desequilibri; una informació que és crucial per a l'establiment de correlacions genotip-fenotip, determinar el pronòstic de anomalia cromosòmica diagnosticada, i per al procés d'assessorament genètic [Gruchy *et al.*, 2008; Tsuchiya *et al.*, 2008; Maya *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Feenstra *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a]. En l'apartat 2.1.2.2 es detalla la taxa de detecció de desequilibris críptics mitjançant CMA en aquells casos de reorganitzacions cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades *de novo*, tant en diagnòstic prenatal com postnatal.

Pel que fa als tipus de plataformes de microarray, n'existeixen dos grans grups: les d'hibridació genòmica comparada (array CGH) i les basades en l'estudi de *single nucleotide polymorphisms* (array SNP). En els arrays CGH, el DNA del pacient i un DNA de referència es marquen amb fluorocroms diferents (Cy5 i Cy3) i es cohibriden sobre una matriu de seqüències de DNA conegudes, que poden ser oligonucleòtids o BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) (Figura 6). Existeixen dos dissenys de plataformes d'array CGH, les *whole-genome*, que permeten la detecció de CNVs al llarg de tot el genoma a elevada resolució; i les *targeted* o

dirigides, que es centren en l'estudi de les regions amb repercussió fenotípica coneguda. Les primeres plataformes *targeted* únicament analitzaven les regions subtelomèriques, pericentromèriques, i de síndromes microdelecionals i microduplicacionals conegudes; però les més actuals també cobreixen el *backbone* genòmic, de manera que presenten una elevada resolució a les regions amb repercussió fenotípica ben establerta i una menor resolució a la resta del genoma [Baldwin *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010; Breman *et al.*, 2012]. Pel que fa a les plataformes d'array SNP, aquestes permeten la detecció de CNVs al llarg de tot el genoma mitjançant l'anàlisi d'SNPs. Únicament requereixen el DNA del pacient per a la hibridació sobre el microarray, i els resultats obtinguts es comparen amb els d'un conjunt de dades control. Actualment, també existeixen plataformes d'array mixtes, anomenades array CGH + SNP [Vermeesch *et al.*, 2012]. És important destacar que els arrays CGH d'elevada resolució presenten una taxa de detecció de CNVs superior a la dels arrays SNP (i que dependrà del nombre, la mida i la distribució de les sondes incloses); però els arrays SNP presenten una sèrie d'avantatges addicionals: capacitat per detectar isodisomies uniparentals (i heterodisomies si s'estudien les mostres parentals en paral·lel) i consanguinitat, detecció de tots els casos de poliploidia, i major sensibilitat per detectar mosaics amb proporcions baixes d'una línia cel·lular determinada [Schaaf *et al.*, 2011; Srebniak *et al.*, 2011].

Atès que la majoria de desequilibris cromosòmics amb repercussió fenotípica són rars i no recurrents, per a l'estudi d'individus amb retard mental i/o altres anomalies congènites es recomana la utilització de plataformes que cobreixin tot el genoma a una elevada resolució [Koolen *et al.*, 2009; Zuffardi *et al.*, 2011]. En diagnòstic prenatal, durant anys s'ha preferit la utilització de plataformes *targeted*, principalment amb l'objectiu de minimitzar la detecció de VOUS; però les publicacions més recents indiquen que la utilització de plataformes de microarray *whole-genome* durant l'etapa prenatal permetria un increment de la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants, sense un augment significatiu de la detecció de VOUS [Coppinger *et al.*, 2009; Breman *et al.*, 2012]. A més, les plataformes *targeted* presenten la limitació de que necessiten ser actualitzades de forma contínua, ja que constantment es descriuen noves síndromes microdelecionals i microduplicacionals [Vermeesch *et al.*, 2012].

2. Anomalies cromosòmiques

2.1. Anomalies cromosòmiques: tipus, incidència, repercussió fenotípica i diagnòstic

La classificació tradicional de les alteracions cromosòmiques distingeix entre anomalies numèriques i estructurals, en funció de si varia el nombre o l'estructura dels cromosomes. Més recentment, i degut a la introducció de les tècniques de citogenètica molecular, que ofereixen un poder de resolució molt superior al del cariotip convencional, s'ha introduït

una nova classificació. Aquesta diferència entre anomalies microscòpiques i anomalies submicroscòpiques o críptiques, en funció de si l'alteració és visible o no al microscopi òptic. Mentre que les anomalies cromosòmiques numèriques sempre són microscòpiques, les estructurals poden ser microscòpiques o críptiques. En funció del tipus d'alteració diagnosticada, les seves característiques quant a incidència, repercussió fenotípica, risc de recurrència i origen variaran notablement.

D'altra banda, cal remarcar que qualsevol anomalia cromosòmica, ja sigui numèrica o estructural, es pot trobar en forma de mosaic constitucional, que es defineix com la coexistència en un mateix individu de dues o més línies cel·lulars que només es diferencien genèticament per una alteració cromosòmica, havent-se produït l'error en una divisió cel·lular durant l'embriogènesi [Gardner *et al.*, 2012]. La repercussió fenotípica dels mosaics constitucionals variarà en funció de: i) la distribució de les diferents línies cel·lulars en l'individu, que dependrà del moment del desenvolupament embrionari en què s'ha originat i de les línies cel·lulars en què ha tingut lloc; ii) del cromosoma implicat; i iii) de la viabilitat de la línia cel·lular anòmala. En diagnòstic prenatal, es parla de mosaicisme confinat a placenta quan existeix una discrepància entre la constitució cromosòmica de la placenta i dels teixits embrionaris.

2.1.1. Anomalies cromosòmiques numèriques

Les anomalies cromosòmiques numèriques es classifiquen en: aneuploidies, poliploidies, i cromosomes marcadors supernumeraris.

En les **aneuploïdies** la dotació cromosòmica és anòmala degut a l'excés o defecte d'un o varis cromosomes (trisomies i monosomies, respectivament) (Figura 7A i 7B). Les aneuploïdies dels cromosomes sexuals són les anomalies cromosòmiques més freqüents a la població, amb una prevalença de l'1,8‰. En concret, les que presenten una major incidència són la Síndrome de Klinefelter (47,XXY) en homes, i la Sd. de Turner (45,X) en dones. Pel que fa a les aneuploïdies clàssiques, les prevalences de les trisomies 21, 18 i 13 a la població són del 1,2‰, 0,15‰ i 0,08‰, respectivament [Hook and Hamerton, 1978]. És important destacar, però, que la freqüència de les aneuploïdies clàssiques a la població ha disminuït progressivament durant els últims anys, com a conseqüència de la implantació dels programes de cribratge prenatal dirigits a la seva detecció, i a l'opció majoritària per part de les gestants d'interrompre aquelles gestacions amb anomalies cromosòmiques [Soler-Casas *et al.*, 2006].

La repercussió fenotípica de les aneuploïdies és molt variable en funció de si el cromosoma implicat és un autosoma o un cromosoma sexual. Mentre que les aneuploïdies autosòmiques presenten una afectació fenotípica severa, que inclou retard mental, malformacions congènites i dismòrfies; la repercussió fenotípica de les aneuploïdies sexuals més freqüents (excepte la monosomia X en línia pura) acostuma a ser lleu, podent associar-se a esterilitat i/o malformacions menors. La monosomia autosòmica en línia pura és sempre mortal en les etapes més

primerenques de la vida embrionària, i es creu que la monosomia X en línia pura també és mortal intraúter; de manera que únicament sobreviuen aquells fetus que presenten l'anomalia en forma de mosaic. Els embrions amb trisomies autosòmiques sobreviuen més temps que els monosòmics, però les úniques trisomies autosòmiques compatibles amb la vida en línia pura són les dels cromosomes 13, 18 i 21.

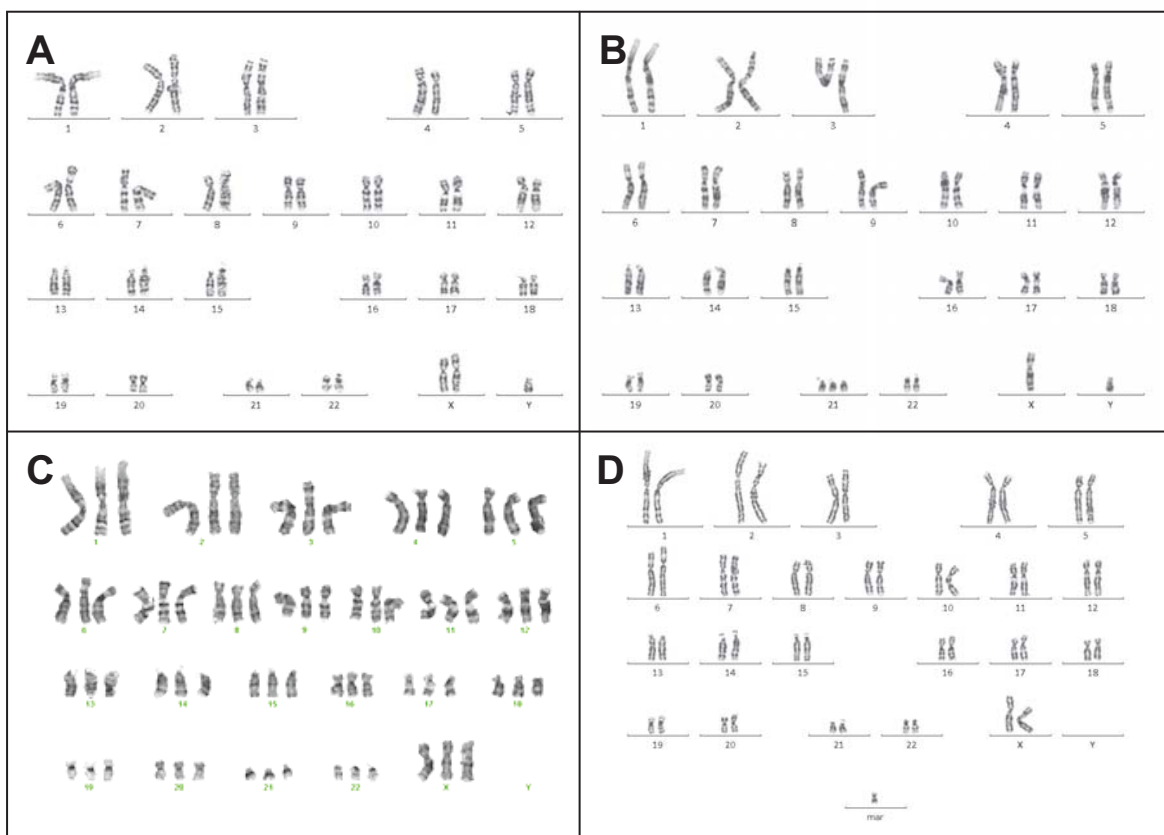


Figura 7. Anomalies cromosòmiques numèriques. **A.** Cariotip 47,XXY (Sd. de Klinefelter). **B.** Trisomia del cromosoma 21 (Sd. de Down). **C.** Triploidia. **D.** Cromosoma marcador supernumerari.

Les **poliploidies** es caracteritzen per la presència d'un nombre de cromosomes múltiple a l'haploide ($n=23$) però major al diploide ($2n$). Les triploidies, caracteritzades per una dotació cromosòmica $3n$ (Figura 7C),

són relativament freqüents durant l'etapa prenatal, diagnosticant-se en l'1-3% dels embarassos reconeguts. En canvi, les tetraploïdies, en què la dotació cromosòmica és $4n$, són molt menys comunes. Les poliploïdies rarament arriben a terme i no són compatibles amb la vida [Gardner *et al.*, 2012].

Finalment, els **cromosomes marcadors supernumeraris** (*supernumerary marker chromosomes*, SMCs) es defineixen com a cromosomes estructuralment anòmals addicionals als 46 cromosomes normals, de mida igual o menor al cromosoma 20 de la mateixa metafase, i no caracteritzables per citogenètica convencional (Figura 7D) [Liehr *et al.*, 2009a]. La seva freqüència en població no seleccionada de nounats és del 0,04%, i s'estima que la seva prevalença en pacients amb retard mental és 10 vegades superior [Liehr *et al.*, 2004]. La repercussió fenotípica dels cromosomes marcadors és molt variable, degut al seu origen heterogeni i a que sovint es distribueixen en forma de mosaic en els diferents teixits de l'organisme [Crolla *et al.*, 2005]. Aproximadament el 30% dels cromosomes marcadors diagnosticats *de novo* s'associen a anomalies congènites, generalment com a conseqüència del material genètic extra. No obstant, les anomalies congènites també poden ser degudes a disomia uniparental (DUP) del cromosoma del qual deriva el marcador si aquest està sotmès a *imprinting* o presenta una mutació en un gen recessiu [Liehr *et al.*, 2009a; Liehr *et al.*, 2011]. El cromosoma marcador supernumerari més freqüent és l'inv dup(15), tot i que s'han descrit SMCs derivats de tots els cromosomes

[Liehr *et al.*, 2004; Base de dades *on line* de SMCs creada per Thomas Liehr].

La prevalença de les anomalies cromosòmiques numèriques en diagnòstic prenatal és significativament superior a l'observada durant l'etapa postnatal, ja que hi ha un elevat nombre d'embrions amb alteracions numèriques que es perden espontàniament. S'ha determinat que un 15% dels embarassos reconeguts resulten en avortaments espontanis (generalment en primer trimestre) i, d'aquests, el 50-70% presenten alteracions cromosòmiques, sent les més freqüents les anomalies numèriques [Fritz *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2008; Ljunger *et al.*, 2011]. No obstant, la incidència dels diferents tipus d'anomalies cromosòmiques numèriques durant l'etapa prenatal en població no seleccionada de gestants és difícil de determinar, ja que el cariotip mai s'ha ofert de forma universal a totes les embarassades. Per tant, els resultats dels estudis publicats estan condicionats per la proporció de les diferents indicacions de realització de procediment invasiu de diagnòstic prenatal. La sèrie més gran publicada fins el moment (N=31.615), amb el 69,5% de les mostres referides per cribratge bioquímic positiu, el 18,4% per edat materna avançada i el 5,7% per anomalies ecogràfiques, va reportar les següents freqüències: 1,1% de trisomia 21; 0,3% de trisomia 18; 0,03% de trisomia 13; 0,17% de monosomia X; i 0,1% de Sd. de Klinefelter [Han *et al.*, 2008]. Pel que fa als cromosomes marcadors supernumeraris, la incidència en diagnòstic prenatal és del 0,075%; però quan la indicació del procediment

invasiu és l'existència d'anomalies ecogràfiques, la seva freqüència és superior (0,2%) [Liehr *et al.*, 2009a].

Les anomalies cromosòmiques numèriques s'acostumen a diagnosticar per citogenètica convencional (Figura 7). No obstant, durant l'etapa prenatal moltes alteracions numèriques ja han estat prèviament identificades mitjançant tècniques de detecció ràpida de les aneuploïdies més comunes. En relació als cromosomes marcadors supernumeraris, per a determinar el seu origen es requereix la utilització de tècniques de citogenètica molecular.

2.1.2. Anomalies cromosòmiques estructurals

En les reorganitzacions cromosòmiques estructurals el nombre de cromosomes no es veu alterat, però sí la seva morfologia i/o composició.

Es classifiquen en:

- Deleccions: Es caracteritzen per la pèrdua de material genètic, donant lloc a monosomies cromosòmiques parcials (Figura 8G). Es classifiquen en terminals, quan inclouen les regions cromosòmiques subtelo mèriques; i intersticials, quan no les inclouen.
- Duplicacions: Quan es produeix un guany de material genètic, comportant una trisomia cromosòmica parcial (Figura 8H). Les duplicacions també poden ser terminals o intersticials.
- Translocacions recíproques: Es produeixen per un intercanvi recíproc de material genètic entre dos cromosomes, amb un punt de trencament a cadascun d'ells (Figura 8A).

–Translocacions robertsonianes: Són el resultat de la fusió de dos cromosomes acrocèntrics (cromosomes 13, 14, 15, 21 i 22) per la regió centromèrica. Es classifiquen en homòlogues, quan els dos cromosomes implicats en la reorganització són del mateix parell cromosòmic; i heteròlogues, quan no ho són. La translocació robertsoniana més freqüent és la que involucra els cromosomes 13 i 14 (Figura 8B).

–Inversions: Es formen a partir del trencament d'un segment intracromosòmic i la seva posterior inserció en la posició original però en sentit invers. Es classifiquen en: pericèntriques, quan la regió invertida inclou el centròmer; i paracèntriques, quan no l'inclou (Figura 8D).

–Insercions (o translocacions insercionals): En les insercions típiques es produeix la intercalació d'un fragment d'un cromosoma a un altre (intercromosòmiques), o al mateix cromosoma però en un lloc diferent a l'original (intracromosòmiques); de manera que s'observen tres punts de trencament cromosòmic. Les insercions recíproques, molt menys freqüents, són el resultat d'un intercanvi de segments cromosòmics intersticials entre dos cromosomes no homòlegs, i requereixen quatre punts de trencament (Figura 8C).

–Reorganitzacions complexes: Es caracteritzen per ser anomalies cromosòmiques estructurals que comporten l'intercanvi de material genètic entre tres o més cromosomes.

–Isocromosomes: Són cromosomes metacèntrics que presenten dos braços genèticament idèntics i posicionats en sentit invers. Els isocromosomes més freqüents són l'i(Xq) i l'i(21q), que involucren els braços llargs del cromosoma X i els del cromosoma 21, respectivament (Figura 8F).

–Cromosomes en anell: Són el resultat del trencament d'un cromosoma en dos punts i la posterior fusió dels extrems lliures del fragment intersticial, resultant en una estructura circular (Figura 8E).

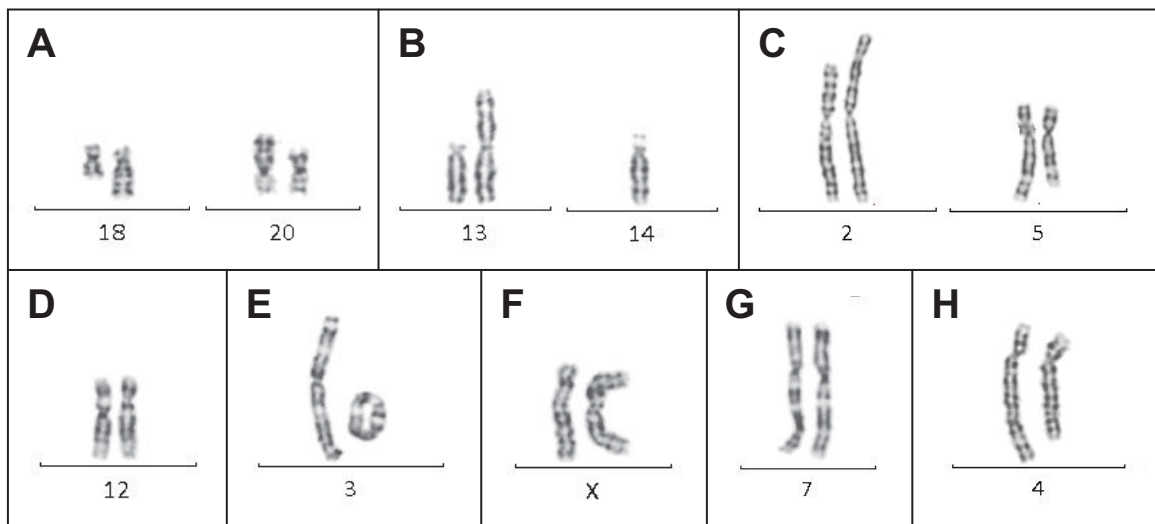


Figura 8. Cariotips parcials d'anomalies cromosòmiques estructurals. **A.** Translocació recíproca entre el cromosoma 18 i el 20, $t(18;20)(q12.2;p11.2)$. **B.** Translocació robertsoniana entre els cromosomes 13 i 14, $der(13;14)(q10;q10)$. **C.** Inserció recíproca entre els cromosomes 2 i 5, $t(2;5)(p23p21;q15q33)$. **D.** Inversió del cromosoma 12, $inv(12)(p11.2q13.3)$. **E.** Cromosoma 3 en anell, $r(3)$. **F.** Isocromosoma de braços llargs del cromosoma X, $i(X)(q10)$. **G.** Deleció intersticial del cromosoma 7, $del(7)(q11q21.1)$. **H.** Duplicació del cromosoma 4, $dup(4)(q35q31)$.

Les reorganitzacions cromosòmiques estructurals poden ser **equilibrades**, si no es produeix un guany i/o pèrdua de material genètic; o

bé **desequilibrades**, quan hi ha desequilibri cromosòmic. D'altra banda, en funció de la seva mida es classifiquen en microscòpiques (>5-10Mb) i submicroscòpiques o críptiques (<5-10Mb). Algunes reorganitzacions cromosòmiques estructurals són sempre microscòpiques (translocacions robertsonianes, isocromosomes i cromosomes en anell), mentre que d'altres tant poden ser microscòpiques com críptiques (delecions, duplicacions, translocacions recíproques, inversions, insercions i reorganitzacions complexes).

2.1.2.1. Anomalies cromosòmiques estructurals microscòpiques

Les anomalies cromosòmiques estructurals microscòpiques són aquelles de mida igual o superior a 5-10Mb i, per tant, visibles al microscopi òptic. S'estima que la freqüència de les reorganitzacions estructurals aparentment equilibrades en població no seleccionada és del 0,522%, mentre que per a les desequilibrades és del 0,061% [Jacobs *et al.*, 1992]. En recent nascuts, s'ha descrit que la incidència de les translocacions recíproques, translocacions robertsonianes i inversions equilibrades és del 1,43‰, 1,23‰ i 0,11‰, respectivament [Gardner *et al.*, 2012].

Durant l'etapa prenatal, es detecta una reorganització cromosòmica estructural microscòpica en 1 de cada 1.000 gestacions que es sotmeten a un procediment invasiu per a l'obtenció del cariotip fetal [Warburton, 1991]. La freqüència de les translocacions recíproques, translocacions robertsonianes i inversions *de novo* aparentment equilibrades en diagnòstic prenatal és del 0,5‰; 0,1‰ i 0,1‰, respectivament [Warburton, 1991].

El risc d'anomalies congènites varia significativament en funció de si es produeix pèrdua i/o guany de material genètic o no. Les reorganitzacions en desequilibri acostumen a associar-se amb anomalies fenotípiques severes, com a conseqüència de trisomies i/o monosomies cromosòmiques parcials; i el fenotip observat dependrà de la regió genòmica en desequilibri, la seva densitat gènica, la funció dels gens que conté, i la seva sensibilitat als canvis de dosi. D'altra banda, la majoria de les reorganitzacions cromosòmiques equilibrades són heretades i generalment no s'associen a anomalies fenotípiques en l'individu portador, encara que poden aparèixer problemes relacionats amb la fertilitat. No obstant, malgrat que el risc d'anomalies congènites per als portadors de reorganitzacions cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades és baix, aquest és superior al de la població general. S'ha estimat que un 6,1% de les translocacions recíproques i un 9,4% de les inversions *de novo* aparentment equilibrades al cariotip s'associen a alteracions fenotípiques [Warburton, 1991]. Aquests fenotips anòmals poden ser conseqüència de:

- i) la reorganització no és realment equilibrada i presenta desequilibris submicroscòpics en els punts de trencament;
- ii) s'ha produït un desequilibri críptic en una regió del genoma aparentment no relacionada amb la reorganització diagnosticada;
- iii) s'interrompen gens dosi-sensitius en els punts de trencament;
- iv) es produeix un efecte de posició gènica; o
- v) l'anomalia ha comportat fenòmens de disomia uniparental d'un cromosoma

sotmès a *imprinting* o que presenta una mutació en un gen recessiu [Sismani *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2009].

Les reorganitzacions cromosòmiques estructurals microscòpiques s'acostumen a diagnosticar per citogenètica convencional (Figura 8), tot i que per a la seva correcta caracterització pot ser necessari l'ús de tècniques de citogenètica molecular.

2.1.2.2. Anomalies cromosòmiques estructurals críptiques

Les reorganitzacions cromosòmiques críptiques són aquelles que es troben per sota dels límits de resolució de la microscopia òptica (<5-10Mb) i que, per tant, únicament poden diagnosticar-se mitjançant tècniques de citogenètica molecular, com la FISH, l'MLPA, o la CMA. El seu diagnòstic és relativament recent i, en conseqüència, la freqüència d'alguns tipus de reorganitzacions estructurals críptiques es desconeix. Les més estudiades han estat les desequilibrades, ja que acostumen a associar-se a anomalies congènites. Alguns d'aquests desequilibris críptics són recurrents i han estat molt ben caracteritzats, donant lloc a la descripció de síndromes microdelecionals i microduplicacionals ben establerts.

Durant molts anys, els estudis per a la detecció d'anomalies cromosòmiques críptiques es van centrar en el cribratge de les regions subtelomèriques en individus amb anomalies congènites i cariotip normal; i les sèries més extenses publicades van revelar que el 3-6% d'aquests pacients presentaven desequilibris críptics de les regions subtelomèriques [Ravnan *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2008; Stegmann *et al.*, 2008].

El desenvolupament recent de les tècniques de CMA, que ofereixen la possibilitat d'estudiar tot el genoma a una resolució molt superior a la del cariotip, ha revolucionat el camp del diagnòstic citogenètic. En els últims anys s'han publicat nombroses sèries d'individus amb retard mental i/o malformacions congènites i cariotip normal estudiats per CMA, i aquestes han revelat que el 10-15% d'aquests pacients presenten desequilibris cromosòmics críptics [Sagoo *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010].

En diagnòstic prenatal, els estudis publicats amb cohorts més àmplies que avaluen la utilitat de la CMA per al conjunt d'indicacions de procediment invasiu reporten taxes de detecció de desequilibris críptics clínicament rellevants en gestacions amb cariotip normal d'aproximadament el 0,3-5,5% [Fiorentino *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Breman *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a; Wapner *et al.*, 2012]. Quan únicament es considera la indicació d'anomalies ecogràfiques, aquesta taxa es situa entre l'1,8% i el 9,4% [Tyreman *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010; Armengol *et al.*, 2012; Faas *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012b; Wapner *et al.*, 2012]. Aquests valors coincideixen amb els que es troben detallats a la Taula 2, excepte pel treball de Tyreman *et al.* (2009), en què la taxa de desequilibris críptics clínicament rellevants és del 9,4% (enlloc del 10,4% que es reporta a la taula), ja que una de les anomalies diagnosticades per CMA i no detectada per citogenètica convencional no era de mida submicroscòpica (mosaic de trisomia 10). És important destacar que en aquelles gestacions amb

anomalies ecogràfiques i cariotip normal, les alteracions cromosòmiques críptiques són significativament més freqüents (increment de pràcticament el 50%) en aquells fetus amb malformacions congènites múltiples que en aquells amb anomalies ecogràfiques aparentment aïllades [Lee *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012b].

Per a les indicacions clíniques de diagnòstic prenatal que presenten un risc baix d'anomalia cromosòmica estructural (p.e. edat materna avançada o ansietat materna), estudis recents utilitzant CMA han revelat que el 0,2-2,2% d'aquestes gestacions presenten desequilibris cromosòmics críptics [Maya *et al.*, 2010; Strassberg *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wapner, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a].

D'altra banda, les tècniques de CMA han posat de manifest que una proporció elevada dels pacients amb anomalies congènites i reorganitzacions cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades originades *de novo* presenten desequilibris cromosòmics críptics, o bé en els punts de trencament de la reorganització cromosòmica o en altres regions del genoma. Concretament, la taxa de detecció de desequilibris submicroscòpics en pacients amb translocacions recíproques o inversions (i anomalies congènites) és del 37% (dels quals el 49% es localitzen en els punts de trencament); i per a reorganitzacions cromosòmiques complexes és del 93% [Gribble *et al.*, 2005; De Gregori *et al.*, 2007; Sismani *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2008; Schluth-Bolard *et al.*, 2009; Gijssbers *et al.*, 2010; Feenstra *et al.*, 2011]. En diagnòstic prenatal, també

s'ha demostrat que un percentatge significatiu de reorganitzacions cromosòmiques *de novo* aparentment equilibrades per citogenètica convencional s'associen a desequilibris críptics. Lee *et al.* (2012) han reportat que l'11,8% (2/17) de les translocacions recíproques aparentment equilibrades *de novo* presenten desequilibris críptics en els punts de trencament. D'altra banda, Shaffer *et al.* (2012a) han publicat recentment una sèrie molt extensa que inclou fetus amb reorganitzacions cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades estudiades mitjançant CMA, i han reportat que la freqüència de desequilibris críptics en els punts de trencament en els casos de translocacions recíproques, inversions i insercions és del 7,9% (15/189), 4,5% (2/44) i 33,3% (2/6); respectivament. No obstant, en aquest estudi no s'especifica la proporció de reorganitzacions *de novo* i heretades.

Pel que fa a la repercussió fenotípica dels desequilibris cromosòmics críptics, aquesta varia en funció de si es produeix guany o pèrdua de material genètic, i de la regió genòmica en desequilibri: mida, densitat gènica, posició, funció dels gens que conté, i la seva sensibilitat als canvis de dosi [Vermeesch *et al.*, 2012]. En general, es considera que les CNVs de mida inferior a 0,1Mb, les duplicacions i les variants heretades és menys probable que siguin patogèniques que les CNVs grans (>1Mb), les delecions i les variants *de novo*, respectivament [Vermeesch *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010; Faas *et al.*, 2012].

Finalment, cal comentar que les reorganitzacions cromosòmiques críptiques únicament poden diagnosticar-se mitjançant tècniques de citogenètica molecular, com la FISH, l'MLPA, o la CMA. Per al diagnòstic d'aquelles anomalies críptiques que es troben en forma equilibrada, la FISH acostuma a ser la tècnica d'elecció; mentre que per a les desequilibrades pot utilitzar-se CMA, MLPA o FISH.

2.1.2.2.1. Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2

La Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 és la síndrome microdeleccional més freqüent a la població, amb una incidència del 0,17-0,25‰ en nounats. S'associa a malformacions cardíques congènites (principalment defectes conotruncals), hipocalcèmia, anomalies oropalatals, absència de timus, deficiències immunològiques, dismòrfia facial, dèficit intel·lectual i/o desordres psiquiàtrics [Bretelle *et al.*, 2010]. És important destacar, però, que l'expressió clínica d'aquesta síndrome és molt variable, de manera que alguns individus presenten la totalitat de la simptomatologia mentre que d'altres són pràcticament asimptomàtics. El 90% dels pacients presenten una deleció de 3Mb en hemizigosi de la regió cromosòmica 22q11.2; i en la majoria de casos la microdelecció s'origina *de novo* [Edelmann *et al.*, 1999].

En diagnòstic prenatal, el signe d'alarma més important per a la detecció de la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 és la malformació cardíaca, especialment els defectes conotruncals.

Concretament, s'ha descrit que el 5,4% dels fetus amb cardiopatia i cariotip normal presenten aquesta síndrome microdeleccional [Bretelle *et al.*, 2010].

2.2. Anomalies cromosòmiques: origen

Les alteracions cromosòmiques constitucionals poden ser heretades o *de novo*, però totes elles s'han originat per primera vegada en algun moment. La gran majoria són conseqüència d'un procés de divisió cel·lular erroni, que ha tingut lloc durant la meiosi o bé durant la mitosi [Gardner *et al.*, 2012].

Les **aneuploïdies** generalment són conseqüència d'un error en la segregació dels cromosomes durant la meiosi, que resulta en una no-disjunció cromosòmica. Aquesta no-disjunció dona lloc a gàmetes disòmic i nul·lisòmic, que al fecundar produiran zigots trisòmic i monosòmic, respectivament. Si l'error es produeix en la primera divisió meiòtica (meiosi I), els dos cromosomes homòlegs presents en el mateix gàmeta seran diferents, donant lloc a heterodisomia del cromosoma implicat. En canvi, si l'error es produeix en la segona divisió meiòtica (meiosi II), ambdós cromosomes seran idèntics, donant lloc a isodisomia (Figura 9). És important destacar que la no-disjunció durant la meiosi és un fenomen relativament freqüent, i que la majoria d'aneuploïdies autosòmiques són degudes a errors durant l'oogènesi (principalment en meiosi I), mentre que les aneuploïdies dels cromosomes sexuals acostumen a ser conseqüència d'errors durant l'espermatogènesi [Gardner *et al.*, 2012]. Malgrat que les

aneuploïdies són generalment d'origen meiòtic, també poden ser conseqüència d'un error de no-disjunció durant la mitosi.

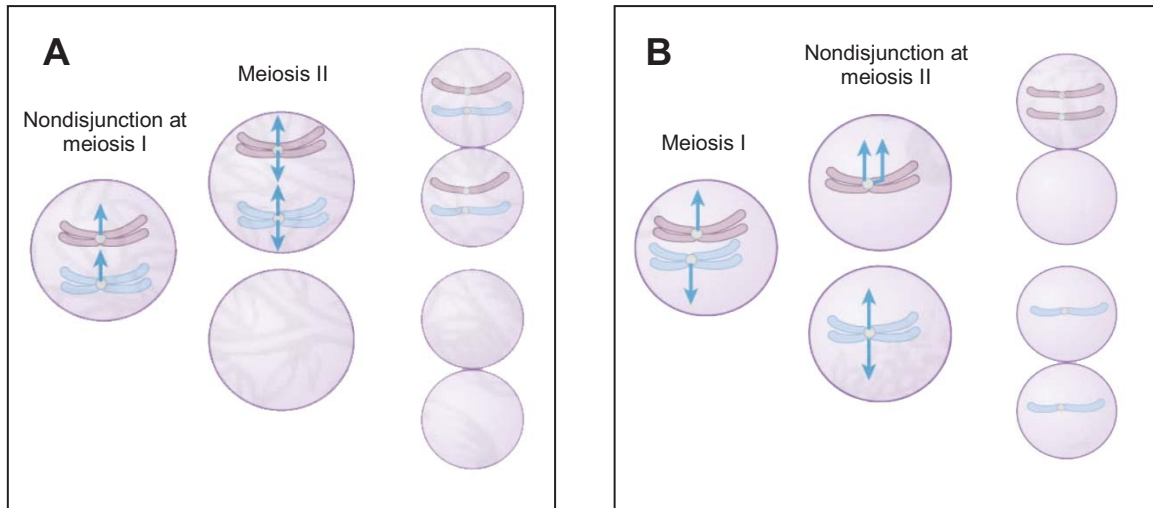


Figura 9. Representació esquemàtica de no-disjunció en meiosi I (A) i meiosi II (B). Imatge extreta de Adkison and Brown, 2007.

En relació a l'origen les **poliploïdies**, la causa més comú de triploïdia és la fecundació d'un òvul per dos espermatozoides (dispèrmia). No obstant, també existeix la possibilitat de que l'espermatozou o l'òvul siguin diploides degut a un error de no-disjunció meiòtic. Les tetraploïdies acostumen a ser el resultat de la no finalització de la primera divisió zigòtica, de manera que els cromosomes es repliquen però la cèl·lula no es divideix [Gardner *et al.*, 2012].

Els mecanismes de formació dels **cromosomes marcadors supernumeraris** difereixen notablement en funció de la seva morfologia. L'inv dup(15), que és el cromosoma marcador més freqüent, generalment és el resultat d'un intercanvi en forma de U entre cromosomes 15 homòlegs

durant la meiosi materna, que es veu afavorit per l'existència de *low copy repeats* (LCRs) localitzats a 15q11-q14 [Liehr *et al.*, 2004].

Pel que fa a la formació de les **reorganitzacions cromosòmiques estructurals**, tant microscòpiques com críptiques, s'han descrit tres models: recombinació homòloga no al·lèlica (*non-allelic homologous recombination*, NAHR); *non-homologous end-joining* (NHEJ), i *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS). D'aquests, el mecanisme millor descrit és l'NAHR, que és el resultat d'un malalineament de seqüències del genoma que presenten un alt grau d'homologia (normalment LCRs), i la consegüent recombinació entre elles (generalment durant la meiosi, però també pot produir-se durant la mitosi). En funció de si aquests errors en la recombinació es produeixen entre cromosomes no homòlegs, cromosomes homòlegs, cromàtides germanes, o dins de la mateixa cromàtide, i també de si els LCRs es troben en la mateixa direcció o invertits; el tipus d'anomalia estructural resultant serà diferent. En la Figura 10 es mostra com l'NAHR entre repeticions situades en cromosomes homòlegs, cromàtides germanes i dins la mateixa cromàtide pot donar lloc a delecions, duplicacions, inversions o cromosomes isodicèntrics. L'NAHR és el mecanisme principal de formació de les reorganitzacions cromosòmiques recurrents (p.e. les síndromes microdelecionals i microduplicacionals), tot i que també pot donar lloc a reorganitzacions estructurals no recurrents [Gu *et al.*, 2008]. Les translocacions també poden ser el resultat de NAHR, però en aquest cas entre cromosomes no homòlegs [Gu *et al.*, 2008].

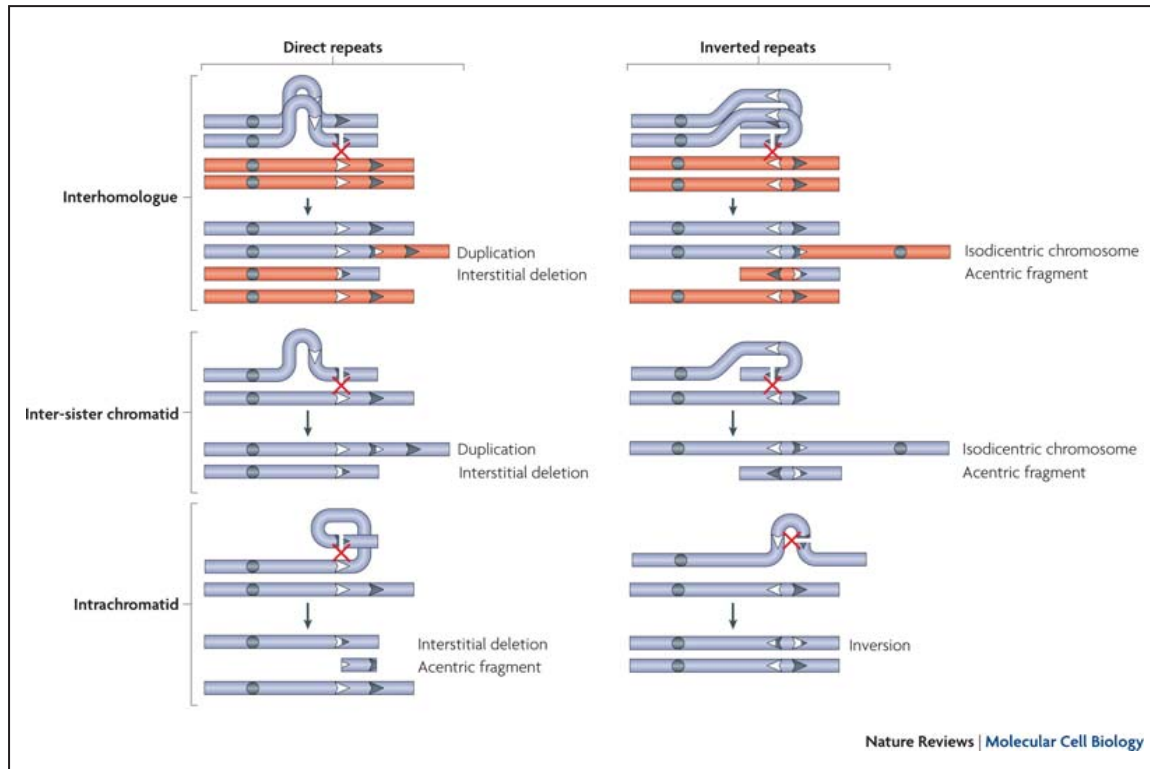


Figura 10. Representació esquemàtica d'NAHR entre cromosomes homòlegs, cromàtides germanes i dins la mateixa cromàtide per a les dues possibles orientacions dels LCRs (representats amb fletxes que indiquen la seva direcció). Imatge extreta de Sasaki *et al.*, 2010.

L'NHEJ és un mecanisme de reparació de trencaments del DNA. Concretament, es produeix quan en la replicació del DNA durant la mitosi es produeixen trencaments de la doble cadena de DNA, i enlloc de reunir-se els extrems trencats de forma correcte, aquests es lliguen de forma incorrecte, originant deletions o duplicacions en el punt de trencament; o es produeix una lligació entre extrems trencats de diferents regions del genoma, donant lloc a translocacions [Gu *et al.*, 2008; Lieber *et al.*, 2010]. La FoSTeS també és el resultat d'un error en la replicació del DNA durant la mitosi. En aquest cas, però, la forquilla de replicació activa “para” en una posició, i la cadena de DNA que s'està sintetitzant es separa de la cadena

motlle i “salta” a una altra cadena motlle que presenta microhomologia amb l'anterior, ja sigui en el mateix cromosoma o en un cromosoma diferent, i llavors segueix la síntesi de DNA utilitzant la nova cadena motlle. Aquest procés es pot repetir varies vegades abans de que es reassumeixi la replicació utilitzant la cadena motlle original [Gu *et al.*, 2008]. L'NHEJ i la FoSTeS, a diferència de l'NAHR, apliquen particularment a les delecions i duplicacions no recurrents [Vissers *et al.*, 2009]; i es pensa que la FoSTeS és la base de les reorganitzacions cromosòmiques complexes, com per exemple triplicacions i combinacions delecio/duplicació [Zhang *et al.*, 2009].

Per tant, les anomalies cromosòmiques estructurals *de novo* poden originar-se tant durant la meiosi com durant la mitosi. Remarcablement, al contrari del que succeeix amb les aneuploïdies, la majoria de les reorganitzacions estructurals *de novo* s'originen durant la gametogènesi masculina [Shaffer and Lupski, 2000].

D'altra banda, és important tenir present que alguns casos de delecions i/o duplicacions cromosòmiques poden ser el resultat de l'herència en desequilibri d'una reorganització cromosòmica parental:

- Si un progenitor és portador d'una translocació recíproca, durant la meiosi I els cromosomes implicats en la translocació s'aparellen amb els seus homòlegs formant una estructura tetravalent, que pot segregar de diverses maneres, donant lloc a gàmetes equilibrats o desequilibrats. Si la segregació és 2:2 (dos cromosomes a cada cèl·lula filla), existeixen les següents possibilitats de segregació: a)

alternant (equilibrada, un gàmeta conté els dos cromosomes no reorganitzats i l'altre els dos cromosomes derivatius); b) adjacent-1 (desequilibrada, donant lloc a embrions amb trisomia i monosomia dels fragments cromosòmics translocats); c) adjacent-2 (desequilibrada, es formaran embrions amb trisomia i monosomia dels fragments no translocats dels cromosomes reorganitzats). Si la segregació és 3:1 (tres cromosomes a una cèl·lula filla i un a l'altra), poden presentar-se dues situacions, ambdues desequilibrades: a) els dos cromosomes normals i un derivatiu segreguen a una de les cèl·lules filles i l'altre derivatiu segrega a l'altra cèl·lula filla; b) a diferència de l'anterior els dos cromosomes derivatius segreguen junts a una cèl·lula filla junt amb un homòleg normal (Figura 11A). La segregació 4:0, que donaria lloc a gàmetes doble disòmic i doble nul·lisòmic, només es contempla a nivell teòric, ja que són inviàbles [Gardner *et al.*, 2012].

- En el cas de les translocacions robertsonianes parentals, durant la meiosi I es forma una estructura trivalent, que podrà segregar de forma: a) alternant (segregació 2:1, equilibrada, un gàmeta conté els dos cromosomes no reorganitzats i l'altre el derivatiu); b) adjacent (2:1, desequilibrada, un gàmeta conté el cromosoma derivatiu i un cromosoma no reorganitzat, i l'altre gàmeta l'altre cromosoma no reorganitzat, de manera que al fecundar s'originaran embrions trisòmics i monosòmics) (Figura 11B). La segregació 3:0, que donaria

lloc a gàmetes doble disòmic i doble nul·lisòmic, es produeix molt rarament [Honda *et al.*, 2000; Durban *et al.*, 2001].

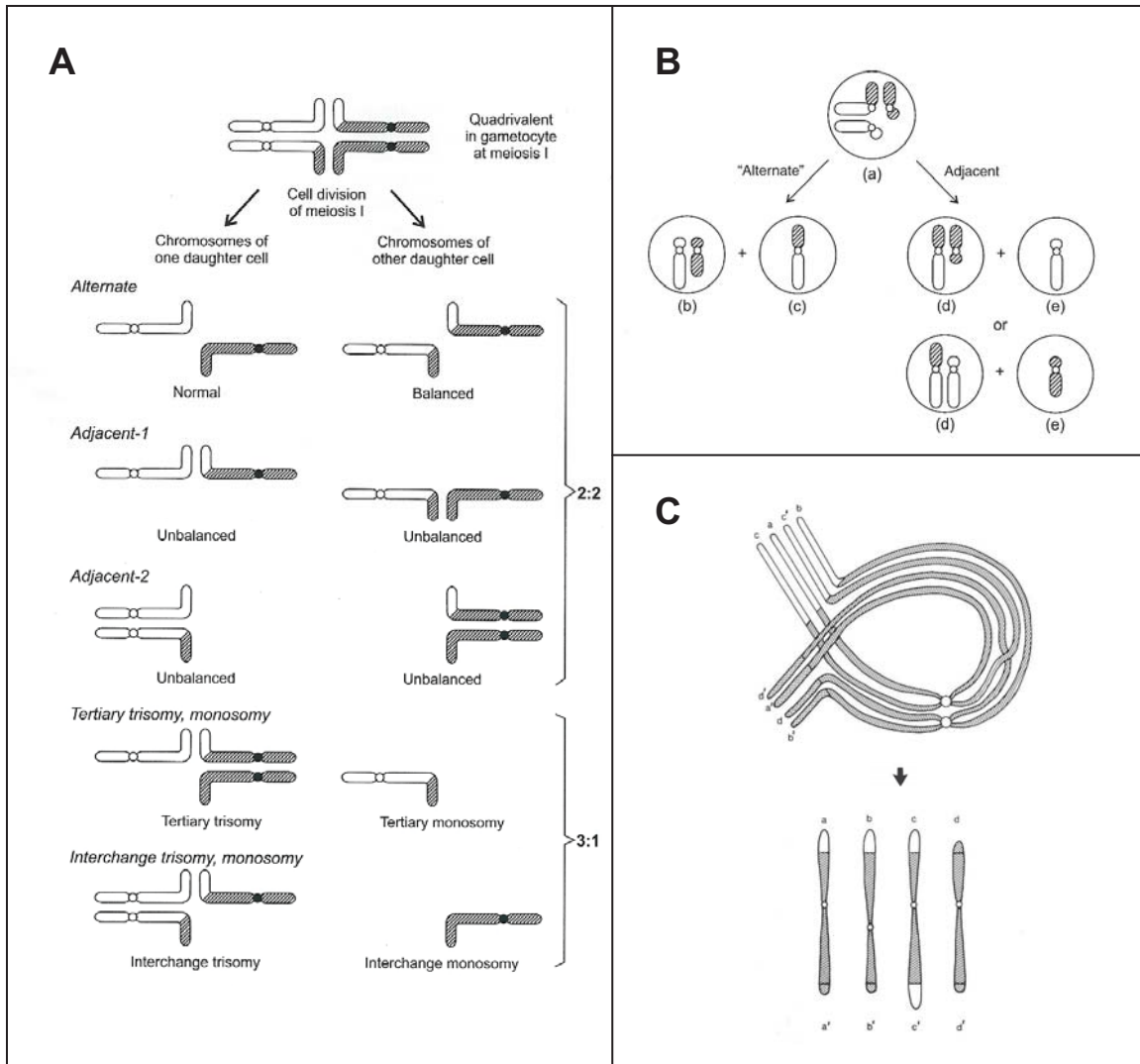


Figura 11. Representació de les possibles segregacions en meiosi I per a translocacions recíproques (A) i translocacions robertsonianes (B), i esquema de la recombinació en meiosi I d'un cromosoma amb una inversió pericèntrica i el seu homòleg (C). Imatges extretes de Gardner *et al.*, 2012.

- Pel que fa a les inversions parentals, durant l'aparellament dels cromosomes homòlegs en meiosi I es forma un bucle entre la cromàtide normal i la invertida, i si es produeix una recombinació dins d'aquest bucle, s'originaran quatre tipus de gàmetes diferents: un

portador del cromosoma normal, un portador de la inversió, i dos portadors de les formes recombinants (desequilibrades). Els recombinants possibles per a les inversions pericèntriques són: un cromosoma amb duplicació de la regió no invertida del braç p i deleció de la regió no invertida del braç q, i un cromosoma amb la forma desequilibrada inversa (Figura 11C). En el cas de les inversions paracèntriques, les formes recombinants donarien lloc a un cromosoma acèntric i un de dicèntric.

Finalment, cal comentar que, tot i que la majoria d'alteracions cromosòmiques numèriques i anomalies cromosòmiques estructurals constitucionals són conseqüència d'errors durant la meiosi, també és possible que s'originin postzigòticament, en una divisió cel·lular mitòtica. En aquests casos, l'anomalia generalment s'observa en forma de mosaic [Gardner *et al.*, 2012]. És important remarcar que, per a les alteracions numèriques, els mosaics tant poden ser el resultat d'un error mitòtic en un conceptus que inicialment era cromosòmicament normal, com d'un error mitòtic en un conceptus que inicialment presentava un cariotip anòmal (degut a un error meiòtic previ) i en el qual s'ha produït una correcció postzigòtica.

2.3. Anomalies cromosòmiques: risc de recurrència

El risc de recurrència per a la majoria d'**anomalies cromosòmiques numèriques** és baix, però hi ha una sèrie de consideracions que s'han de tenir presents. El risc d'una gestació amb trisomia 21, trisomia 13 i trisomia

18 es correlaciona directament amb l'edat materna (quan les trisomies són regulars). És per això que quan es diagnostica una aneuploïdia clàssica en una gestant jove, és més probable que aquesta sigui deguda a problemes de disjunció durant la meiosi que al factor edat. Això implica que el risc de recurrència (de la mateixa trisomia o d'una de diferent) variï significativament en funció de a quina edat de la gestant s'hagi diagnosticat l'aneuploïdia. Així, les gestants de menys de 30 anys amb antecedents de trisomia 21 en una gestació prèvia, tenen un risc de recurrència de la mateixa trisomia 8,2 vegades superior al d'una altra gestant de la mateixa edat sense antecedents (i un risc d'una trisomia viable diferent de 2,4x); mentre que aquelles gestants en les quals la trisomia 21 s'ha diagnosticat després dels 30 anys, el risc de recurrència és d'1,6x per la mateixa trisomia i d'1,7x per una trisomia viable diferent. De forma similar, el risc de recurrència de trisomia 13 o 18 per a una gestant de menys de 35 anys és de 7,8x; mentre que si l'edat és superior als 35 el risc es situa al 2,2x. Pel que fa a les aneuploïdies dels cromosomes sexuals, normalment no presenten recurrència, encara que en alguns casos, com la trisomia X i la síndrome de Klinefelter, s'han associat a l'edat materna [Gardner *et al.*, 2012].

Dins de les alteracions numèriques, els cromosomes marcadors supernumeraris requereixen una menció especial. El 39% dels cromosomes marcadors són familiars, i en aquests casos el risc de recurrència és elevat. No obstant, si el progenitor portador no presenta

anomalies fenotípiques, el més probable és que la descendència tampoc en presenti, tot i que s'han descrit algunes excepcions a aquesta norma, especialment en casos en què el progenitor presenta el marcador en forma de mosaic [Liehr *et al.*, 2004]. Els cromosomes marcadors poden associar-se, ocasionalment, a DUP del cromosoma del qual deriva el marcador. Si el cromosoma implicat està sotmès a *imprinting* o presenta una mutació en un gen recessiu (en cas d'isodisomia), s'observaran anomalies fenotípiques en l'individu portador. És important destacar, però, que no s'ha descrit cap cas a la literatura de cromosoma marcador heretat associat a DUP [Liehr *et al.*, 2011].

Pel que fa a les **anomalies cromosòmiques estructurals**, tant microscòpiques com críptiques, els riscos de recurrència variaran significativament en funció de si són *de novo* o heretades. Per a aquelles reorganitzacions que siguin familiars, el risc de descendència amb la reorganització cromosòmica (ja sigui en la seva forma equilibrada o desequilibrades) és elevat. En el cas de les translocacions recíproques heretades, el risc de descendència desequilibrada sol variar entre el 0 i el 30%, i la seva estimació depèn de diversos factors com: els possibles gàmetes desequilibrats viables, el tipus de segregació que donarà lloc a gàmetes viables, la forma en la que la reorganització ha estat establerta a la família (avortaments de repetició, individus amb afectació fenotípica, per atzar, etc.), i el sexe del progenitor transmissor. El risc ha de ser estimat per a cada translocació en concret, ja que cada regió cromosòmica té una

densitat gènica i conté gens diferents, i algunes translocacions presenten patrons de segregació característics [Gardner *et al.*, 2012].

Per a les translocacions robertsonianes familiars, el risc de descendència desequilibrada varia significativament en funció dels cromosomes implicats en la reorganització. Per als individus portadors de translocacions robertsonianes homòlogues, la probabilitat de descendència equilibrada és extremadament baix; mentre que per a les heteròlogues es situa entre el 85% i el 99%, en funció dels cromosomes implicats i del sexe del progenitor portador. Per a les translocacions robertsonianes, és important tenir present que si es produeix una correcció de trisomia en l'embrió, aquesta pot donar lloc a DUP. Si la DUP involucra un cromosoma sotmès a *imprinting* (dels acrocèntrics: el 14 i el 15) o que presenta una mutació en un gen recessiu (en cas d'isodisomia), l'alteració cromosòmica s'associarà a anomalies congènites [Gardner *et al.*, 2012].

Pel que fa a les inversions, el risc de descendència desequilibrada en portadors d'inversions paracèntriques és molt baix; mentre que en les pericèntriques el risc de produir un gàmeta desequilibrat viable degut a recombinació normalment és major com major és el fragment invertit. En una família en què una inversió pericèntrica ha estat diagnosticada a partir d'un individu desequilibrat, el risc de descendència desequilibrada s'ha estimat en un 5-15%; mentre que si la inversió pericèntrica s'ha identificat per altres motius, el risc és aproximadament de l'1% [Gardner *et al.*, 2012].

D'altra banda, algunes delecions o duplicacions poden ser heretades, especialment aquelles que s'associen amb penetrància incompleta i/o una elevada variabilitat en l'expressió clínica (p.e. les microdelecions a 22q11.2, responsables de la Sd. de la delecio cromosòmica 22q11.2). En aquesta casos, el risc de recurrència és del 50% [Pierpont *et al.*, 2007].

Si es descarta que els progenitors siguin portadors de la reorganització cromosòmica estructural diagnosticada en el cas índex (microscòpica o críptica), indicant que aquesta és *de novo*, els riscos de recurrència són molt baixos. Malgrat això, no es pot descartar la possibilitat de mosaicisme germinal en un dels progenitors, que seria el resultat d'un error mitòtic premeiosi que ha comportat que part de les gònades presentin la línia cel·lular anòmala. El mosaicisme germinal també es pot donar per a les alteracions cromosòmiques numèriques [Gardner *et al.*, 2012].

3. Indicacions de procediment invasiu de diagnòstic prenatal

Atès que la realització d'un procediment invasiu a totes les gestants de forma rutinària queda descartada pel risc de pèrdua gestacional associat a la tècnica d'obtenció de la mostra i pel seu elevat cost econòmic, ja des de la implementació dels estudis citogenètics en l'etapa prenatal es van establir criteris de selecció d'aquelles gestants amb un risc més elevat d'anomalia cromosòmica fetal. Un dels objectius prioritaris sempre ha estat la detecció de gestacions amb trisomia 21, ja que aquesta aneuploidia és la causa més freqüent de retard mental a la població.

Al llarg dels anys, els criteris de selecció de gestants a risc d'alteracions cromosòmiques fetals han evolucionat, permetent cada vegada una taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques superior (major sensibilitat) i una menor proporció de falsos positius (major especificitat). L'edat materna avançada (primer igual o superior a 35 anys, i posteriorment a 38) va ser durant molts anys el principal criteri de selecció de gestants a risc d'anomalia cromosòmica. En l'actualitat, però, l'edat materna avançada com a criteri únic es considera obsoleta al nostre país, i els programes de sanitat implantats només contempen com a indicacions per a la realització d'un procediment invasiu de diagnòstic prenatal: les anomalies ecogràfiques, el cribratge de primer o segon trimestre positiu, les anomalies cromosòmiques parentals, les anomalies cromosòmiques prèvies, i altres indicacions menys freqüents [Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals, 2008].

3.1. Anomalies ecogràfiques

El 14% de les gestacions amb anomalies ecogràfiques presenta una anomalia cromosòmica microscòpica, i aquesta forta associació fa que sigui recomanable la realització del cariotip fetal quan es diagnostica una anomalia estructural en primer o segon trimestre de la gestació [Nicolaidis *et al.*, 1992]. També és important destacar que les alteracions cromosòmiques microscòpiques són significativament més freqüents en aquells fetus amb malformacions congènites múltiples (29%) que en aquells amb anomalies ecogràfiques aparentment aïllades (2%) [Nicolaidis

et al., 1992]. En aquest darrer grup, el risc d'anomalia cromosòmica varia significativament en funció de la malformació diagnosticada, sent les anomalies ecogràfiques que presenten valors predictius positius més elevats l'higroma quístic/hidrops, les malformacions esquelètiques, les anomalies gastrointestinals, les anomalies genitals, i les cardiopaties [Staebler *et al.*, 2005].

Algunes malformacions fetals acostumen a associar-se a anomalies cromosòmiques concretes. Per exemple, l'holoprosencefàlia presenta una forta associació amb la trisomia 13; l'hidrops fetal i l'higroma quístic amb la monosomia X i la trisomia 21; l'atrèsia duodenal i els defectes dels coixinets endocardiàcs amb la trisomia 21; i els defectes conotruncals amb delecions de la regió cromosòmica 22q11.2 [Gardner *et al.*, 2012].

D'altra banda, cal remarcar la diferència entre anomalia ecogràfica i marcador ecogràfic. Els marcadors ecogràfics no són pròpiament alteracions estructurals fetals, sinó que són signes ecogràfics que s'observen més freqüentment en fetus amb anomalies cromosòmiques que en fetus amb dotació cromosòmica normal. Quan es troben de forma aïllada, generalment no es consideren una indicació de procediment invasiu de diagnòstic prenatal. El marcador ecogràfic que presenta una major efectivitat com a indicador d'anomalia cromosòmica fetal és la translucidesa nucal incrementada, però també se n'han descrit d'altres, com el *focus* ecogènic intracardiàc, l'ectàsia pièlica, la hiperrefringència

intestinal, el fèmur curt (< percentil 5), els quists de plexes coroïdeus, l'os nasal absent, i el ductus venós revertit.

3.2. Cribratge de primer o segon trimestre positiu

Segons el Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, publicat el 2008 i implementat el 2009, totes les embarassades han de tenir l'opció de realitzar-se un cribratge de primer o segon trimestre de la gestació (preferentment de primer trimestre) que ofereixi una taxa de detecció de trisomia 21 per sobre del 75% i una taxa de falsos positius inferior al 3%. En aquells casos en què el resultat del cribratge sigui positiu (risc superior a 1 en 250), es recomana la realització d'una prova invasiva diagnòstica.

Els mètodes de cribratge existents han estat fonamentalment dissenyats per a la detecció de gestacions amb trisomia 21. No obstant, tenint en compte que els paràmetres que utilitzen també poden veure's alterats per l'existència d'altres anomalies cromosòmiques, els mètodes de cribratge faciliten a la pràctica la detecció d'un espectre més ampli d'alteracions cromosòmiques [Gardner *et al.*, 2012].

El mètode de cribratge de primera elecció al nostre país és el **test combinat bioquímic-ecogràfic de primer trimestre**, que permet el càlcul del risc d'anomalia cromosòmica fetal basant-se en la modificació del risc a priori definit per l'edat materna amb els valors obtinguts per:

- un marcador ecogràfic: la translucidesa nucal (TN), mesurada entre les setmanes 11 i 13 de gestació.

- dos marcadors bioquímics: la fracció β lliure de l'hormona gonadotropina coriònica ($f\beta$ -hCG) i la proteïna A plasmàtica associada a l'embaràs (*pregnancy-associated plasma protein-A*, PAPP-A), determinades entre les setmanes 8 i 13 de gestació.

Una de les característiques diferencials d'aquest mètode de cribratge és que permet obtenir els resultats en el primer trimestre de la gestació, possibilitant la realització d'una prova invasiva de primer trimestre (la biòpsia corial).

Aquelles gestants que accedeixen a la consulta a partir de la setmana 14 de la gestació, se'ls ofereix la possibilitat de participar en el **cribratge bioquímic de segon trimestre**, el més eficaç dels quals és el test quàdruple, que modifica el risc a priori de l'edat amb els següents marcadors bioquímics: $f\beta$ -hCG, alfa-fetoproteïna (AFP), estriol no conjugat (uE3), i inhibina A.

Existeix un altre test que compleix els requisits de sensibilitat i especificitat recomanats, el **cribratge integrat de primer i segon trimestre**, en el qual es calcula el risc d'anomalia cromosòmica fetal a partir d'un marcador ecogràfic de primer trimestre (TN), un marcador bioquímic de primer trimestre (PAPP-A), i quatre marcadors bioquímics de segon trimestre (AFP, $f\beta$ -hCG, uE3 i inhibina-A). El principal desavantatge d'aquest test és que no permet disposar dels resultats fins a la setmana 15 de la gestació.

El càlcul del risc, tant en primer com en segon trimestre, s'ha d'ajustar per una sèrie de factors de correcció que permeten millorar la sensibilitat i l'especificitat del test. Aquests factors són els següents: pes matern, tabaquisme, determinants del grup racial-ètnic de la gestant, gestació prèvia amb anomalia cromosòmica, pèrdues prèvies a l'extracció, diabetis mellitus insulíndependent, gestació única o múltiple (monocorial o bicorial), edat gestacional per amenorrea, paritat, i, en cas de gestacions amb donació d'ovòcits, l'edat de la donant dels ovòcits.

En cas que durant el segon trimestre de la gestació es detectin marcadors ecogràfics d'anomalia cromosòmica, també s'ha de modificar el risc obtingut inicialment en el cribratge, tant de primer com segon trimestre (si els marcadors han estat validats per a poder-se aplicar en el recàlcul del risc). Per recalcular el risc s'han d'utilitzar les raons de probabilitat (*likelihood ratios*) positives i negatives corresponents als marcadors presents i absents, i en cas que el nou resultat sigui superior a 1/250, es recomanarà la realització d'un procediment invasiu.

3.3. Anomalia cromosòmica parental

L'existència d'una anomalia cromosòmica parental constitueix una indicació clara de procediment invasiu de diagnòstic prenatal, ja que generalment existeix un risc elevat de descendència afectada de desequilibris cromosòmics. La situació més comuna és la d'un progenitor portador d'una reorganització estructural (p.e. translocació recíproca, translocació robertsoniana o inversió) o d'un cromosoma marcador. A l'apartat 2.3 es

descriuen detalladament els riscos pels portadors d'aquestes alteracions cromosòmiques de transmetre l'anomalia en desequilibri a la seva descendència.

3.4. Anomalia cromosòmica prèvia

Si es descarta que els pares siguin portadors de l'anomalia cromosòmica diagnosticada en un fill o en una gestació prèvia, el risc de recurrència és baix, tal i com s'ha descrit a l'apartat 2.3. No obstant, el risc és superior al d'una gestant sense antecedents, degut al fet que alguns individus presenten problemes de disjunció durant la meiosi i a la possibilitat de mosaïcisme germinal. En conseqüència, s'acostuma a recomanar la realització d'un procediment invasiu de diagnòstic prenatal en aquests casos.

3.5. Altres indicacions

Aquesta categoria bàsicament inclou aquelles gestants amb història familiar de malaltia de transmissió monogènica amb diagnòstic prenatal disponible (molecular o bioquímic).

4. Etiologia de les anomalies congènites

El 20-25% de les anomalies presents al naixement són d'origen genètic, principalment conseqüència d'alteracions cromosòmiques o malalties monogèniques, aquestes darreres causades per mutacions puntuals en gens concrets [Brent *et al.*, 1993]. La sospita d'una malaltia monogènica específica durant l'etapa prenatal acostuma a ser difícil, excepte en aquells casos en què hi ha una història familiar positiva o el

fetus presenta anomalies ecogràfiques molt suggestives d'una malaltia concreta (p.e. acondroplàsia, hipoacondroplàsia, esclerosi tuberosa, fibrosi quística, i determinades malalties metabòliques).

L'exposició a determinats factors ambientals durant la gestació també és una causa important d'anomalies congènites, entre els quals cal destacar les malalties i infeccions maternes, determinats fàrmacs, drogues d'abús, agents químics, radiació i alcohol. S'ha descrit que aquests factors explicarien el 10% de les anomalies presents en nounats [Brent *et al.*, 1993].

D'altra banda, algunes anomalies congènites poden ser d'origen multifactorial, causades per la interacció de múltiples gens i l'ambient; o degudes a errors espontanis intrínsecs del desenvolupament.

4.1. Etiologia de les cardiopaties congènites

La malformació congènita del sistema cardiovascular és la causa més important de morbiditat i mortalitat durant la infància, i és la malformació que més freqüentment s'observa en nounats, amb una incidència global aproximada del 0,4%. Com qualsevol anomalia congènita, és una entitat molt heterogènia, amb una gran varietat de causes, conegudes i desconegudes, implicades en la seva etiologia. En el 75% dels casos, la cardiopatia es presenta de forma aïllada; però en el 25% restant es troba formant part d'un quadre sindròmic. Durant l'etapa prenatal, la proporció de casos que presenten anomalies extracardíaques és molt superior (75% del total de fetus amb cardiopatia), però molts moren

intraúter o s'opta per una interrupció legal de la gestació [Bulbul *et al.*, 1993].

La majoria de les cardiopaties congènites són d'origen multifactorial, però hi ha una sèrie d'alteracions genètiques i factors ambientals clarament implicats en la seva etiologia. Les causes genètiques de cardiopatia inclouen principalment les anomalies cromosòmiques i les alteracions monogèniques; i entre els factors ambientals clàssicament relacionats amb les malformacions cardíques destaquen les malalties maternes (p.e. diabetis mellitus, fenilcetonúria), les infeccions (rubèola i toxoplasmosis), i l'exposició a teratògens (alcohol, hidantoïnes i liti) [Sandor *et al.*, 1981; Freinkel *et al.*, 1988; Platt *et al.*, 1992; Lacro, 2000; Pierpont *et al.*, 2007].

L'associació entre **alteracions cromosòmiques** microscòpiques i cardiopatia congènita està àmpliament documentada. El 30% dels pacients portadors d'anomalies cromosòmiques visibles al cariotip presenten cardiopatia; i en el 8-13% dels nounats amb cardiopatia es detecta una alteració cromosòmica microscòpica [Ferencz *et al.*, 1989]. En diagnòstic prenatal, s'ha reportat que la freqüència d'anomalies cromosòmiques microscòpiques en fetus amb anomalies ecogràfiques cardíques és del 22-56,3% [Gembruch *et al.*, 1997; Chaoui *et al.*, 1999; Manji *et al.*, 2001; Comas Gabriel *et al.*, 2002; Paladini *et al.*, 2002; Bellucco *et al.*, 2010]. Tant durant l'etapa prenatal com postnatal, quan la cardiopatia s'acompanya de malformacions a altres òrgans o sistemes, la probabilitat de detecció d'una anomalia cromosòmica és especialment elevada. Les

alteracions cromosòmiques que més freqüentment s'associen a cardiopatia són la trisomia 21 (40-50% dels casos), la trisomia 18 (100%), la trisomia 13 (80%), i la monosomia X (20-40%) [Hyett *et al.*, 1995; Hyett *et al.*, 1997; Mazzanti *et al.*, 1998; Paladini *et al.*, 2000; Langford *et al.*, 2005]. Les duplicacions o delecions cromosòmiques parcials també s'associen a cardiopatia congènita en el 13,2% dels casos, sent les més freqüents la tetrasomia 22q11.2 o Síndrome de l'ull de gat, i la tetrasomia 12p o Sd. de Pallister-Killian [Freedom *et al.*, 1973; Reynolds *et al.*, 1987; Baena *et al.*, 2003].

Les anomalies cromosòmiques críptiques també poden associar-se a cardiopatia congènita. Com s'ha descrit detalladament a l'apartat 2.1.2.2.1, la Sd. de la delecio cromosòmica 22q11.2 s'acompanya amb elevada freqüència de malformacions cardíques, especialment de defectes conotruncals. Una altra síndrome microdelecional que acostuma a associar-se a cardiopatia congènita és la Sd. de Williams-Beuren, causada per una delecio en hemizigosi de la regió cromosòmica 7q11.23. Aquesta síndrome presenta una incidència de 1/20.000 nascuts vius i es caracteritza clínicament per, a part de la cardiopatia (generalment estenosis aòrtica supraalvular): hipercalcèmia neonatal, anomalies esquelètiques i renals, dèficit cognitiu, personalitat social, i dismòrfia facial [Martens *et al.*, 2008]. En els últims anys, la utilització de plataformes de CMA ha permès la descripció de nombrosos desequilibris críptics associats a defectes cardíacs. Concretament, la utilització d'aquesta tecnologia ha

revelat que el 17-25% dels pacients amb cardiopatia sindròmica i el 10-17% dels individus amb cardiopatia no sindròmica presenten desequilibris cromosòmics submicroscòpics [Thienpont *et al.*, 2007; Erdogan *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008; Greenway *et al.*, 2009; Breckpot *et al.*, 2010].

D'altra banda, hi ha diverses **síndromes genètiques causades per mutacions puntuals en gens concrets** que acostumen a associar-se a cardiopatia congènita, les més freqüents de les quals són:

- Síndrome de Noonan, caracteritzada clínicament per: talla baixa, collalat, dismòrfia facial, i en el 90% dels casos per cardiopatia, principalment estenosi valvular pulmonar i miocardiopatia hipertròfica. Presenta una prevalença de 1/2.000 nascuts vius i segueix un patró d'herència autosòmic dominant [Marino *et al.*, 1999]. És una síndrome genèticament heterogènia, amb almenys tres gens implicats en la seva etiologia: *PTPN11*, *SOS1* i *KRAS* [Schubbert *et al.*, 2006; Tartaglia *et al.*, 2007]. Prenatalment, la síndrome pot sospitar-se en presència d'alguns signes ecogràfics, com l'higroma quístic, la translucidesa nucal incrementada i l'hidrops fetal. S'ha descrit que el 1-3% dels fetus amb cariotip normal i increment del plec nucal en primer trimestre de la gestació podrien presentar aquesta síndrome [Hiippala *et al.*, 2001].
- Síndrome de Marfan: és el trastorn de teixit connectiu més freqüent a la població, amb una prevalença de 1/20.000 i d'herència autosòmica dominant. Presenta una gran variabilitat pel que fa a la seva expressió clínica, i pot afectar l'esquelet, el sistema ocular i el cardiovascular.

Pràcticament tots els individus amb aquesta síndrome acaben desenvolupant alteracions cardiovasculars, sent les més comunes el prolapse de la vàlvula mitral i/o la dilatació de l'arrel aòrtica. La majoria de casos són causats per mutacions en el gen *FBN1* [Milewicz *et al.*, 1998].

- Síndrome de Holt-Oram, caracteritzada per la presència d'anomalies en l'extrem radial de les extremitats superiors, i en el 75% dels casos per cardiopatia (generalment defectes septals atrials i/o ventriculars amb bloqueig progressiu de la conducció atrioventricular) [Basson *et al.*, 1994]. La síndrome està causada per mutacions en el gen *TBX5*, i s'hereta de forma autosòmica dominant, tot i que la majoria de casos són esporàdics per mutació espontània [Holt and Oram, 1960; Garg *et al.*, 2003]. Presenta una incidència de 1 en 100.000 [Basson *et al.*, 1994].
- Síndrome d'Alagille, caracteritzada clínicament per l'absència o disminució del nombre de conductes biliars acompanyada de tres dels següents signes clínics: cardiopatia, colèstasi, anomalies esquelètiques, anomalies oculars i dismòrfia facial. Les anomalies cardíaques estan presents en el 90% dels casos, i les més freqüents són l'estenosi perifèrica de l'artèria pulmonar, la tetralogia de Fallot i l'estenosi valvular pulmonar. Presenta una freqüència estimada de 1 en 100.000, i un patró d'herència autosòmic dominant [McElhinney *et al.*, 2002]. La majoria dels casos són conseqüència de mutacions en el gen *JAG1*, tot i que en

el 3-7% dels pacients s'observa una deleció de la regió cromosòmica on mapa el gen (20p12) [Krantz *et al.*, 1997].

Entre alteracions cromosòmiques i malalties monogèniques, s'han descrit més de 750 síndromes que inclouen els defectes cardíacs entre els seus signes cardinals [Pajkrt *et al.*, 2004]. Això comporta que, durant l'etapa prenatal, en la qual la informació fenotípica disponible és limitada, determinar l'etiologia de les cardiopaties en aquells fetus amb cariotip normal i estudi de la regió 22q11.2 negatiu sigui especialment difícil.

5. Procediments invasius per a l'obtenció del cariotip fetal

En l'actualitat, el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques o alteracions monogèniques acostuma a realitzar-se a partir de cèl·lules fetals obtingudes mitjançant un procediment invasiu. Generalment, els teixits estudiats són les vellositats corials, el líquid amniòtic o la sang fetal, obtinguts mitjançant biòpsia de còrion, amniocentesi i cordocentesi, respectivament. És important comentar que tot procediment invasiu, com el seu nom indica, comporta una invasió del medi fetal; i, en conseqüència, existeix un risc de pèrdua fetal secundari a la tècnica.

La **biòpsia de còrion** consisteix en l'obtenció de vellositats corials per via transabdominal o transcervical. El cariotip es pot obtenir en dos dies si es realitza un cultiu semi-directe (s'analitza el citotrofoblast), però per al resultat del cultiu llarg cal esperar una mitjana de dues setmanes (estudi del mesènquima). A partir d'una fracció de la mostra de vellositat corial fresca es pot dur a terme l'estudi ràpid de les aneuploidies clàssiques i dels

cromosomes sexuals mitjançant QF-PCR o FISH en interfase, i també es poden realitzar estudis moleculars per al diagnòstic de malalties monogèniques. No és recomanable realitzar les biòpsies de còrion abans de la setmana 10 de gestació, ja que s'ha reportat un risc incrementat d'anomalies reduccionals de les extremitats. També és important tenir present que el risc de pèrdua gestacional espontània durant les dues setmanes posteriors al procediment és de l'1,6% [Borrell *et al.*, 1999; Tabor *et al.*, 2009].

L'**amniocentesi** consisteix en l'extracció de líquid amniòtic mitjançant una punció percutània de l'abdomen matern fins al sac amniòtic. A partir d'una fracció de la mostra en fresc també pot realitzar-se un estudi ràpid de detecció de les aneuploïdies clàssiques i dels cromosomes sexuals mitjançant QF-PCR o FISH en interfase, però per a l'obtenció del cariotip fetal caldrà esperar una mitjana de 17 dies, ja que és imprescindible disposar d'un cultiu cel·lular. L'amniocentesi pot realitzar-se amb seguretat a partir de les 16 setmanes de gestació, quan les membranes coriònica i amniòtica ja estan fusionades. El risc de pèrdua gestacional espontània durant les dues setmanes posteriors al procediment és del 0,8% [Borrell *et al.*, 1999; Tabor *et al.*, 2009].

En la **cordocentesi** s'obté sang fetal a partir d'una punció transabdominal materna dirigida al cordó umbilical, i el cariotip es pot obtenir en tres dies. Presenta un risc de pèrdua gestacional lleugerament superior al de la biòpsia corial i l'amniocentesi, i no s'aconsella la seva

realització abans de les setmanes 18-19 de la gestació. Únicament es recorre a aquesta tècnica en casos molt concrets, com per exemple quan un diagnòstic bioquímic només és possible en sang fetal, si una gestació està molt avançada i es vol disposar del cariotip en un període breu de temps (p.e. quan es diagnostiquen anomalies congènites fetals en l'ecografia de les 20 setmanes), o en alguns casos de mosaicisme fetal [Dugoff and Hobbins, 2002].

6. Assessorament genètic en diagnòstic prenatal

Tot i que definir assessorament genètic resulta complex, des d'un punt de vista general es pot descriure com el procés durant el qual els pacients (o els seus parents) a risc d'una malaltia que pot ser hereditària són advertits de les conseqüències de la malaltia, de les probabilitats de desenvolupar-la o transmetre-la, i dels mètodes pels quals és pot prevenir, evitar o millorar [Harper, 2004]. Durant l'etapa prenatal, l'assessorament genètic presenta algunes característiques diferencials, que es discuteixen a continuació. Malgrat això, hi ha una sèrie d'aspectes que són sempre comuns per a qualsevol procés d'assessorament genètic: i) la informació proporcionada ha de ser clara i acurada, i que resolgui en la mesura del possible tots el dubtes que es plantegin; ii) ha de ser un procés no dirigit, respectant l'autonomia dels pacients, i els seus valors i creences; iii) requereix professionals amb àmplia formació i experiència en aquest camp [Gardner *et al.*, 2012].

Durant l'etapa prenatal, en l'**assessorament genètic pretest** la gestant i la seva parella són informats del risc de que la gestació en curs presenti una alteració genètica i la seva possible associació amb anomalies congènites, i de la opció de procediment invasiu per a la seva detecció. El risc ha de ser estimat per a cada gestació en concret, tenint en compte els antecedents familiars i de la gestació en curs, com per exemple la presència d'anomalies ecogràfiques. Durant l'assessorament genètic pretest també s'ha d'informar de la dificultat d'interpretació d'algunes alteracions genètiques, de que per a la interpretació dels resultats poden requerir-se mostres parentals, de la possibilitat de troballes no desitjades en el fetus (i que en alguns casos poden revelar informació dels progenitors) (p.e. alteracions associades amb malalties d'aparició tardana, infertilitat, predisposició a càncer o a malalties neurològiques), i de que l'obtenció d'un resultat normal no exclou l'existència d'una alteració no diagnosticable mitjançant la metodologia utilitzada [Vetro *et al.*, 2012; Vermeesch *et al.*, 2012].

L'**assessorament genètic posttest** és especialment important quan es diagnostica prenatalment una alteració genètica, i els següents aspectes han de ser discutits i tractats en profunditat: repercussió fenotípica i pronòstic de l'anomalia, possibles actuacions obstètriques, possibilitat de que l'anomalia sigui heretada i estudis parentals que cal realitzar per determinar-ho, risc de recurrència, i mètodes mitjançant els quals és pot prevenir en futures gestacions. La presència d'un especialista amb àmplia

experiència en assessorament genètic durant l'etapa prenatal és especialment important en aquests casos, ja que el diagnòstic d'una alteració genètica fetal generalment suposa un fort impacte per a la gestant i la seva parella, i la informació proporcionada s'ha d'assimilar en un període de temps breu per tal de prendre decisions en relació a la gestació en curs (p.e. sobre actuacions obstètriques, incloent la interrupció legal de la gestació) [Vetro *et al.*, 2012].

Com s'ha esmentat anteriorment, proporcionar informació sobre les diferents opcions reproductives que té cada parella per tal d'aconseguir descendència no afectada de l'alteració genètica prèviament diagnosticada és un dels aspectes fonamentals de l'assessorament genètic posttest. Existeixen diverses possibilitats que han de ser comentades i discutides en profunditat. Les parelles poden optar per una gestació natural i realitzar-se un procediment invasiu (preferentment biòpsia corial) per tal de conèixer la condició fetal i, en funció del resultat, plantejar-se l'opció d'interrupció legal de la gestació. Una altra possibilitat és el diagnòstic genètic preimplantatori (DGP), que consisteix en la realització d'una fecundació *in vitro* per injecció intracitoplasmàtica d'esperma (ICSI, *Intracytoplasmatic Sperm Injection*), el posterior estudi genètic d'un o dos blastòmers obtinguts quan els embrions es troben a l'estadi de vuit cèl·lules, i finalment la transferència dels embrions sans. És obvi que el DGP presenta unes característiques molt atractives, però cal tenir present (i explicar a la parella) que es tracta un procediment costós, laboriós i llarg; i cal ser realistes amb les taxes

d'obtenció d'embrions sans i d'implantació post DGP. Per exemple, en aquelles parelles portadores d'una anomalia cromosòmica, el percentatge d'embrions transferibles d'aquells que han estat biopsiats amb èxit és del 25,2%; i la taxa d'implantació d'aquests embrions és del 23,4% [Goossens *et al.*, 2012]. És per això que el DGP únicament s'acostuma a realitzar a aquelles parelles amb anomalies cromosòmiques i problemes de fertilitat que els impossibiliten aconseguir gestacions naturals, i també a aquelles parelles que per motius ètics o religiosos no contempen una interrupció de la gestació en cas d'afectació fetal. Altres opcions reproductives que cal comentar a les parelles són la donació de gàmetes (substitució dels gàmetes del progenitor portador de l'alteració genètica pels d'un donant no portador), la donació d'embrions lliures d'alteració genètica, o l'adopció.

D'altra banda, és fonamental que quan es diagnostica prenatalment una alteració genètica heretada, l'assessorament genètic es faci extensiu a la resta de membres de la família a risc de ser portadors, ja que aquests també tenen un risc incrementat de tenir descendència amb anomalies congènites degut a l'alteració genètica familiar.

Finalment, cal fer una menció especial a l'assessorament genètic d'aquelles alteracions genètiques que presenten penetrància incompleta i/o una elevada variabilitat en l'expressió clínica, tant inter com intrafamiliar, com és el cas de la Sd. de la deleció cromosòmica 22q11.2 [Pierpont *et al.*, 2007]. L'assessorament genètic prenatal d'aquestes famílies és particularment complex, ja que sovint és impossible predir prenatalment

quina serà l'afectació fenotípica postnatal d'aquells fetus portadors de l'alteració genètica.

7. Perspectives de futur del diagnòstic citogenètic prenatal

En l'actualitat, el cariotip convencional segueix sent el *gold standard* del diagnòstic citogenètic prenatal, però es preveu que en els pròxims anys la citogenètica molecular, i en concret les plataformes de CMA, adquireixin un paper molt més rellevant en el diagnòstic d'anomalies cromosòmiques durant l'etapa prenatal. En diagnòstic postnatal, aquesta transició ja és una realitat per a l'estudi d'individus amb retard del desenvolupament, trastorns de l'espectre autista i/o anomalies congènites múltiples d'etiologia desconeguda, i es recomana la utilització dels microarrays com a tècnica de primera elecció per al seu estudi [Miller *et al.*, 2010]. La principal limitació actual per a la realització de CMA en diagnòstic prenatal és la detecció de CNVs de significat clínic incert. Aquestes variants dificulten l'assessorament genètic, i aquest fet és especialment evident durant l'etapa prenatal, en la qual únicament es disposa de la informació ecogràfica. No obstant, s'espera que cada vegada siguin menys les regions del genoma de les quals desconeguem la seva repercussió fenotípica quan es troben en desequilibri [Bui *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2012; Breman *et al.*, 2012].

D'altra banda, la possibilitat de realització de diagnòstics prenatals no invasius, basats en la detecció de material genètic fetal en sang materna, ja és una realitat per al diagnòstic de determinades alteracions genètiques, com per exemple les aneuploidies clàssiques i alteracions gèniques

familiars; i també per a la determinació del sexe fetal i del grup Rh fetal en gestants Rh negatives [Chiu *et al.*, 2011; Papageorgiou *et al.*, 2011, Go *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012]. Malgrat que el diagnòstic prenatal no invasiu encara no ha entrat a la pràctica clínica rutinària, és un camp en el qual s'està investigant intensament, ja que ofereix una elevada sensibilitat sense risc de pèrdues gestacionals. La seva implantació podria permetre en un futur el diagnòstic de les aneuploïdies fetals clàssiques en sang materna a totes les embarassades, fent que la cobertura de la població fos molt més àmplia i es reduís el nombre de procediments invasius que caldria realitzar. Atès que els estudis en plasma matern sembla que estarien destinats bàsicament al diagnòstic de les aneuploïdies clàssiques, el cariotip i/o les tècniques de CMA continuarien tenint un paper important en diagnòstic prenatal, especialment per a l'estudi d'aquelles gestants amb anomalies ecogràfiques fetals o anomalies cromosòmiques familiars.

HIPÒTESI

Actualment, el cariotip convencional és el *gold standard* del diagnòstic citogenètic prenatal, i presenta una taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques d'aproximadament el 3%. En els darrers anys s'han desenvolupat noves tècniques de citogenètica molecular que ofereixen un poder de resolució molt superior al del cariotip, com per exemple l'MLPA i l'anàlisi cromosòmica basada en microarray. Durant l'etapa postnatal, la utilització d'aquestes tècniques en pacients amb retard mental i/o altres anomalies congènites ha permès incrementar exponencialment el nombre de diagnòstics d'anomalies cromosòmiques, i també descriure acuradament aquelles alteracions de difícil caracterització per citogenètica convencional. Aquests resultats tan favorables han portat a que actualment es recomani la utilització de plataformes de microarray com a tècnica de primera elecció per a l'estudi de pacients amb anomalies congènites d'etiologia desconeguda.

D'acord amb aquestes dades, en la present tesi s'ha plantejat la següent **hipòtesi**:

“La utilització de tècniques de citogenètica molecular durant l'etapa prenatal:

- i) permetria ampliar la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques en gestacions amb troballes ecogràfiques fetals;*

- ii) *possibilitaria una millor caracterització de les reorganitzacions cromosòmiques estructurals diagnosticades per citogenètica convencional, facilitant l'establiment de correlacions genotip-fenotip;*
- iii) *determinaria quines troballes ecogràfiques fetals presenten valors predictius més elevats per a la detecció d'anomalies cromosòmiques críptiques; i*
- iv) *posaria de manifest la necessitat d'actualitzar els protocols actuals de diagnòstic citogenètic prenatal.”*

OBJECTIUS

Objectius generals:

- Determinar l'abast diagnòstic i la utilitat del cariotip i les tècniques de citogenètica molecular *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH), *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) i *Chromosomal Microarray-based Analysis* (CMA) en diagnòstic prenatal, especialment per a l'estudi de gestacions amb anomalies ecogràfiques.
- Valorar la necessitat de modificació dels procediments actuals de diagnòstic citogenètic prenatal.

Objectius específics:

- Determinar l'abast diagnòstic del cariotip en líquid amniòtic per a cada indicació de procediment invasiu prenatal a la nostra població de gestants.
- Avaluar la utilitat de l'MLPA subtelomèrica en gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal.
- Comparar les tècniques MLPA específica de cardiopaties i FISH de la regió 22q11.2 per al diagnòstic genètic de fetus amb malformacions cardíques.
- Determinar el potencial diagnòstic de la CMA en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques.

- Descriure les troballes ecogràfiques cardíques que presenten un valor predictiu positiu més elevat per a la detecció d'anomalies cromosòmiques, tant microscòpicament visibles com críptiques.
- Caracteritzar mitjançant tècniques de citogenètica molecular aquelles anomalies cromosòmiques de difícil caracterització per citogenètica convencional, i reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades *de novo*.
- Establir una correlació genotip-fenotip prenatal de les anomalies cromosòmiques diagnosticades, per tal d'oferir un assessorament genètic més acurat.
- Estudiar la necessitat d'implantar nous protocols de diagnòstic citogenètic prenatal.

RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi es presenten en els següents quatre blocs:

1. Recull dels resultats dels estudis citogenètics en líquid amniòtic realitzats entre 1998 i 2009 a l'Hospital Clínic de Barcelona.

Mademont-Soler I, Morales C, Clusellas N, Soler A, Sánchez A; Group of Cytogenetics from Hospital Clínic de Barcelona. Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011;157(2):156-60.

2. Aplicació de la tècnica MLPA subtelomèrica en fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, i en fetus amb anomalies cromosòmiques de difícil caracterització per citogenètica convencional.

Mademont-Soler I, Morales C, Bruguera J, Madrigal I, Clusellas N, Margarit E, Sánchez A, Soler A. Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis? Prenat Diagn. 2010;30(12-13):1165-9.

Mademont-Soler I, Morales C, Madrigal I, Margarit E, Bruguera J, Clusellas N, Martínez JM, Borrell A, Sánchez A, Soler A. Prenatal diagnosis of two different unbalanced forms of an inherited (Y;12) translocation. Am J Med Genet A. 2009;149A(12):2820-3.

3. Comparació de les tècniques MLPA específica de cardiopaties i FISH de la regió 22q11.2 per al diagnòstic genètic de fetus amb malformacions cardíques.

Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Clusellas N, Margarit E, Martínez-Barrios E, Martínez JM, Sánchez A. MLPA: a prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects? Gene. 2012;500(1):151-4.

4. Potencial diagnòstic de la CMA en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques.

Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Martínez-Crespo JM, Shen Y, Margarit E, Clusellas N, Obón M, Wu BL, Sánchez A. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013;41(4):375-82.

1. Recull dels resultats dels estudis citogenètics en líquid amniòtic realitzats entre 1998 i 2009 a l'Hospital Clínic de Barcelona.

Article: "Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade"

Publicat a: European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2011;157(2):156-60.

Autors: Irene Mademont-Soler, Carme Morales, Núria Clusellas, Anna Soler, Aurora Sánchez, Grup de Citogenètica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Resum:

Les alteracions cromosòmiques representen una de les principals causes d'anomalies congènites a la població, i establir la seva freqüència d'acord amb les diferents indicacions clíniques de procediment invasiu durant la gestació és especialment important per a l'assessorament genètic. Amb aquesta finalitat es van analitzar els resultats i les indicacions de les 29.883 mostres de líquid amniòtic referides per estudi citogenètic a l'Hospital Clínic de Barcelona entre els anys 1998 i 2009. En el 99,5% de les mostres es va poder obtenir el cariotip, i la incidència d'anomalies cromosòmiques observada va ser del 2,9%. D'aquestes, el 48,1% consistien en aneuploïdies autosòmiques clàssiques, sent la trisomia 21 la més freqüent. Les indicacions més comunes per a la realització de

l'amniocentesi van ser el cribratge prenatal positiu i l'edat materna avançada; però les indicacions amb un valor predictiu positiu més elevat foren, excloent les anomalies cromosòmiques parentals, la translucidesa nugal augmentada (9,2%) i les anomalies ecogràfiques (6,6%). Els resultats d'aquesta sèrie, que és la més àmplia publicada al nostre país d'aquestes característiques, indiquen que el cariotip en líquid amniòtic és un bon mètode per a la detecció d'anomalies cromosòmiques durant l'etapa prenatal, i destaquen la forta associació entre troballes ecogràfiques i alteracions cromosòmiques fetals. D'altra banda, és important mencionar que el nombre de mostres rebudes va incrementar del 1998 al 2005, i posteriorment va anar disminuint de forma significativa, degut a la implantació del cribratge prenatal de primer trimestre per a la detecció de trisomia 21 i la possibilitat de realitzar el cariotip en vellositats corials.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrb

Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade

Irene Mademont-Soler^a, Carme Morales^{a,b}, Núria Clusellas^{a,b}, Anna Soler^{a,b,c}, Aurora Sánchez^{a,b,c,*}Group of Cytogenetics from Hospital Clínic de Barcelona¹^a Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2010

Received in revised form 18 February 2011

Accepted 19 March 2011

Keywords:

Karyotype

Prenatal diagnosis

Ultrasound abnormalities

Nuchal translucency

Genetic counselling

ABSTRACT

Chromosome abnormalities are one of the main causes of congenital defects, and establishing their frequency according to the different clinical indications for invasive procedure during pregnancy is especially important for genetic counselling. We analyzed the results of 29,883 amniotic fluid samples referred to our laboratory for cytogenetic studies from 1998 to 2009, which constitutes the largest series of cytogenetic analysis performed on amniotic fluid samples in Spain. The number of samples received tended to increase from 1998 to 2005, but after 2005 it decreased substantially. Cytogenetic results were obtained in 99.5% of the samples, and the detected incidence of chromosome abnormalities was 2.9%. Of these, 48.1% consisted of classical autosomal aneuploidies, trisomy 21 being the most frequent one. The main clinical indications for amniocentesis were positive prenatal screening and advanced maternal age, but referral reasons with highest positive predictive values were, excluding parental chromosome rearrangement, increased nuchal translucency (9.2%) and ultrasound abnormalities (6.6%). In conclusion, performing the karyotype on amniotic fluid samples is a good method for the detection of chromosome abnormalities during pregnancy. The number of cytogenetic studies on amniotic fluid has now decreased, however, due to the implementation of first trimester prenatal screening for the detection of Down syndrome, which allows karyotyping on chorionic villus samples. Our results also show that both ultrasound abnormalities and increased nuchal translucency are excellent clinical indicators for fetal chromosome abnormality.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prenatal cytogenetic diagnosis has been recognized for more than 40 years as a reliable method for the detection of fetal chromosome abnormalities. Specifically, amniocentesis was developed at the end of the 1960s as a prenatal diagnosis tool, once culture of amniotic fluid samples was achieved and, as a result, the first fetal karyotypes were obtained [1]. Since the 1970s, amniocentesis has become a routine procedure performed on patients at high risk for fetal chromosome abnormality. Neverthe-

less, due to the increased risk of fetal loss associated with this invasive procedure, clinical indications for offering an amniocentesis have been improved over the years. Initially, advanced maternal age was the main referral reason for amniocentesis, as it was well known that fetal aneuploidies and maternal age are positively correlated [2,3]. Nowadays, advanced maternal age as a single criterion is considered obsolete, as it is included in the prenatal screening for fetal aneuploidies offered to all pregnant women in Spain. Second trimester prenatal screening was introduced in our country at the end of the 80s and includes, apart from maternal age, maternal serum levels of alpha-fetoprotein and the free fraction of human chorionic gonadotropin (hCG). These biochemical parameters together with maternal age reach a detection rate for Down syndrome of 60–80% [4].

During the last decade, and taking advantage of the advances in ultrasound technology, first trimester prenatal screening has been developed. This screening includes two biochemical parameters: maternal serum concentration of hCG and pregnancy-associated

* Corresponding author at: Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic de Barcelona, Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 227 99 40; fax: +34 93 227 56 68.

E-mail address: asanchez@clinic.ub.es (A. Sánchez).

¹ Group of Cytogenetics from Hospital Clínic de Barcelona: Emma Peruga, Marc Papiol, Eduard Castell, Yolanda Viedma, Sabine Richard.

plasma protein A (PAPP-A); one echographic parameter: nuchal translucency (NT); and maternal age. With the application of such screening, the detection rate for Down syndrome reaches 90% [5]. On the other hand, the introduction of first trimester prenatal screening has led to an increase of the demand for chorionic villus sampling, from which a karyotype can be obtained during the first trimester of pregnancy, with the obstetric and psychological advantages that this entails [6]. As a result, the number of prenatal studies on amniotic fluid samples has decreased during the last decade in favour of cytogenetic studies on chorionic villus samplings.

Chromosome abnormalities are one of the main causes of congenital defects and appear in, approximately, 14% of pregnancies with ultrasound abnormalities [7]. To know the frequency of chromosome abnormalities according to the different clinical indications for invasive procedures (not only for ultrasound abnormalities) is very important for the genetic counselling of pregnant women. In this study, we analyze retrospectively the cytogenetic results of 29,883 amniotic fluid samples referred to our laboratory from several medical centres during the last ten years.

2. Materials and methods

We present the cytogenetic results of 29,883 amniotic fluid samples received in our laboratory from 1998 to 2009 (both included). The samples were referred from our hospital maternal-fetal medicine service and from obstetric services of other centres. Although during the study period the region served by our laboratory did not change, the population analyzed changed notably, as the proportion of foreign pregnant women increased progressively. Clinical data of all pregnancies were collected using a standard form.

The amniocentesis indications for prenatal cytogenetic diagnosis were: positive prenatal screening (performed in the first or second trimester), advanced maternal age, patient anxiety, ultrasound abnormalities, increased NT (NT > 99th percentile (p99)), previous aneuploidy, choroid plexus cysts, parental chromosome rearrangement and other indications. Ultrasound abnormalities include fetal and placental malformations, abnormal amniotic fluid volume and intrauterine growth restriction. Cases with more than one referral reason have been classified according to the main clinical indication for prenatal invasive procedure, following the order of priority: parental chromosome rearrangement, ultrasound abnormalities, increased NT (NT > p99), positive prenatal screening, previous aneuploidy and ultrasound markers (such as choroid plexus cysts).

According to Spanish health policies, a prenatal screening and an ultrasound examination in each trimester of the pregnancy have been offered to all pregnant women since the beginning of the study. Second trimester prenatal screening was introduced in the region served by our laboratory in 1998, and first trimester prenatal screening was progressively implemented from 2005 to 2009.

Amniotic fluid samples were cultured and karyotyped according to standard protocols. Twenty G-banded metaphases from two independent cultures of each sample were analyzed using G-banding Wright-staining method [8].

Chromosome abnormalities detected by karyotype analysis were classified into the following categories: classical autosomal aneuploidies (trisomies 21, 18 and 13), sex chromosome aneuploidies, chromosome rearrangements (translocations, inversions, deletions and duplications), supernumerary marker chromosomes, triploidies, and other chromosome abnormalities (including ring chromosomes, multiple chromosome abnormalities and isochromosomes). Polymorphic variants were not considered as chromosome abnormalities, according to Gardner and Sutherland [9].

Finally, we have also briefly analyzed the number of chorionic villus samples (CVS) received from 1998 to 2009, and determined the annual distribution of chromosome abnormalities diagnosed on this tissue during this period.

3. Results

Of the 29,883 amniotic fluid samples received in our laboratory, in 140 (0.5%) the amniotic fluid culture failed. Consequently, results of cytogenetic analysis were obtained in 99.5% of the cases.

In relation to the distribution of amniotic fluid samples over the years, the number of cytogenetic analyses requested increased, with subtle variations, from 1998 to 2004–2005, and from 2005 to 2009 the number of such analyses decreased substantially (Fig. 1).

Focusing on the clinical indications for amniocentesis, they were, in order of frequency: positive prenatal screening (44.1%), advanced maternal age (30%), patient anxiety (6.2%), ultrasound abnormalities (6.2%), increased NT (3.2%), previous aneuploidy (0.7%), choroid plexus cysts (0.7%), parental chromosome rearrangement (0.5%), and other indications (6.7%), which mainly consist of diagnoses of monogenic diseases (Table 1).

Our data also show that the distribution of reasons for referral has changed during the period evaluated. While advanced maternal age was initially the most common indication for amniocentesis, it has been progressively replaced by positive prenatal screening, which is nowadays the most common indication for cytogenetic study (data not shown).

Out of the 29,743 cytogenetic studies performed, 862 (2.9%) presented chromosome abnormalities (Fig. 1 shows the annual distribution of the diagnosed chromosome abnormalities). In cases of mosaicism, the abnormal cell line was considered for the classification. Among chromosome abnormalities, the most frequent ones were classical autosomal aneuploidies (48.1%, 415/862). Trisomy 21, 18 and 13 were diagnosed in 327, 67 and 21 cases, respectively. Sex chromosome aneuploidies represented 13.2% (114/862) of total chromosome abnormalities. Specifically, 43 cases of monosomy X or Turner syndrome, 32 cases of Klinefelter syndrome (47,XXY), 25 triple X and 14 less common sex chromosome aneuploidies (including 46,X,i(Xp), 47,XYY, 48,XXYY and 49,XXXXY) were diagnosed. In the category 'monosomy X' we included, apart from standard monosomies and mosaicisms, cases with structural rearrangements of chromosome X also associated with Turner syndrome phenotype. On the other hand, structural chromosome rearrangements were found in 226 cases (26.2%), including 127 translocations (110 apparently balanced and 17 unbalanced), 65 inversions (64 apparently balanced and 1 unbalanced), 10 duplications and 24 deletions. In relation to supernumerary marker chromosomes and triploidies, we diagnosed 28 and 25 cases, respectively (Table 2).

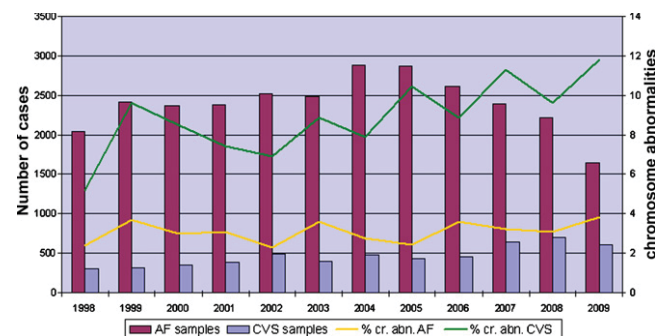


Fig. 1. Annual distribution of cytogenetic studies performed on amniotic fluid and chorionic villus samples, and percentage of chromosome abnormalities diagnosed on both tissues between 1998 and 2009.

Table 1
Clinical indications for cytogenetic analysis on amniotic fluid samples and positive predictive values (PPV) for each indication.

Indications	Number of cases	%	Chromosome abnormalities	PPV %
Positive prenatal screening	13,110	44.1	283	2.2
Advanced maternal age	8934	30.0	211	2.4
Maternal anxiety	1850	6.2	22	1.2
Ultrasound abnormalities	1830	6.2	120	6.6
Increased nuchal translucency	941	3.2	87	9.2
Previous aneuploidy	219	0.7	8	3.7
Choroid plexus cysts	214	0.7	2	0.9
Parental chromosome rearrangement	143	0.5	58	40.6
Other indications ^a	2003	6.7	54	2.7
Without indication	499	1.7	17	3.4
Total	29,743	100	862	

^a Other indications mainly consist of diagnoses of monogenic diseases.

The positive predictive values (PPV) for the different indications were: parental chromosome rearrangement 40.6%, increased NT 9.2%, ultrasound abnormalities 6.6%, previous aneuploidy 3.7%, advanced maternal age 2.4%, positive prenatal screening 2.2%, patient anxiety 1.2%, and choroid plexus cysts 0.9% (Table 1).

Our data also reveal that depending on the chromosome abnormality diagnosed, the distribution of referral reasons changes substantially (Fig. 2). Analyzing the five indications most commonly received in our laboratory (positive prenatal screening, advanced maternal age, ultrasound abnormalities, patient anxiety and increased NT), positive prenatal screening and advanced maternal age were the most common indications for the detection of classical autosomal aneuploidies, sex chromosome aneuploidies (excluding monosomy X), apparently balanced chromosome rearrangements, and supernumerary marker chromosomes. By contrast, ultrasound abnormalities were the most common referral reason for the diagnosis of monosomy X, triploidies, unbalanced chromosome rearrangements and rare trisomies. For such analysis, monosomy X was not included in the category of sex chromosome aneuploidies, as its phenotypic repercussion is considerably different.

In relation to chorionic villus samples, our laboratory performed 5591 cytogenetic diagnoses on this tissue during the period 1998–2009. During these years, the number of studies

requested on CVS increased, reaching the highest values from 2006 to 2009. On the other hand, the percentage of chromosome abnormalities detected on this tissue tended to increase during the period 1998–2009 (Fig. 1).

4. Comments

In this work we present a review of the chromosome abnormalities found on amniotic fluid samples in our laboratory from 1998 to 2009 (both included), which represents the largest series of cytogenetic studies on amniotic fluid in Spain. During the period analyzed, 29,883 amniotic fluid samples were received, and cytogenetic results were obtained in 99.5% of the samples. Consequently, prenatal cytogenetic diagnosis on amniotic fluid samples is a reliable method to obtain the fetal karyotype.

The number of amniotic fluid samples referred for cytogenetic studies varied during the period analyzed. From 1998 to 2005, they showed a significant increase, probably due to the arrival in Spain of foreigners of reproductive age. The most significant change, however, occurred between 2005 and 2009, when the number of amniotic fluid samples received decreased substantially. At the same time (particularly since 2006), the number of CVS referred for cytogenetic analysis increased. These changes are attributable to the progressive implementation of the first trimester prenatal screening for the detection of Down syndrome in our region in 2005, which allows the possibility of performing the karyotype on CVS during the first trimester of pregnancy, with the obstetric and psychological advantages that this entails. On the other hand, as first trimester prenatal screening facilitates a better selection of the pregnancies at risk for aneuploidy than second trimester prenatal screening, the increase in the number of cytogenetic

Table 2
Frequency of the different chromosome abnormalities.

Chromosome abnormalities	Number of cases	%
Classical autosomal aneuploidies	415	48.1
Trisomy 21	327	37.9
Trisomy 18	67	7.8
Trisomy 13	21	2.4
Sex chromosome aneuploidies	114	13.2
Monosomy X	43	5.0
Klinefelter Syndrome	32	3.7
Triple X	25	2.9
Others ^a	14	1.6
Structural rearrangements	226	26.2
Translocations	127	14.7
Balanced	110	12.8
Unbalanced	17	1.9
Inversions	65	7.5
Balanced	64	7.4
Unbalanced	1	0.1
Duplications	10	1.2
Deletions	24	2.8
Supernumerary marker chromosomes	28	3.2
Triploidies	25	2.9
Other chromosome abnormalities^b	54	6.3
Total	862	100

^a 'Others' include the following karyotypes: 47,XYY; 48,XXYY; 49,XXXXY and 46,X,i(Xp).

^b Other chromosome abnormalities include ring chromosomes, multiple chromosome abnormalities, and isochromosomes.

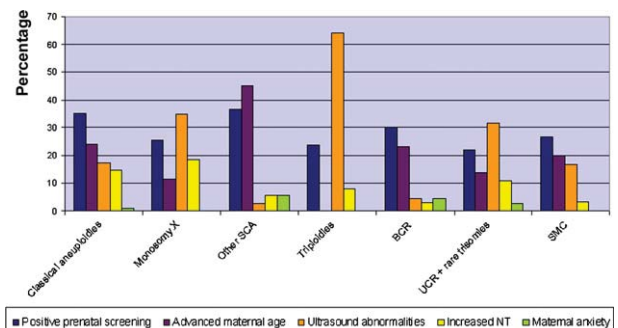


Fig. 2. Analysis of the 5 most common indications for amniocentesis in our population (positive prenatal screening, advanced maternal age, ultrasound abnormalities, patient anxiety and increased nuchal translucency (NT)) for the detection of classical autosomal aneuploidies, monosomy X, other sex chromosome aneuploidies (SCA), triploidies, apparently balanced chromosome rearrangements (BCR), unbalanced chromosome rearrangements (UCR), rare trisomies and supernumerary marker chromosomes (SMC).

studies on CVS has not been as drastic as the decrease of amniotic fluid samples received, and the percentage of chromosome abnormalities detected on CVS has increased.

In relation to the clinical indications for cytogenetic study, the distribution observed in this study is similar to that obtained in other published series [10]. Positive prenatal screening and advanced maternal age are always the most frequent reasons for referral, and they represent in our series 74.1% of total indications. It is important, however, to highlight that the distribution of indications has varied during the period studied. Advanced maternal age was the main referral reason for amniocentesis during the first years, as it was the only parameter known to be associated with Down syndrome. Nevertheless, positive prenatal screening replaced progressively this indication, as it included maternal age and several parameters related to Down syndrome.

Previous studies of amniotic fluid series have revealed that the incidence of chromosome abnormalities ranges between 1.0% and 6.7% [10–17]. We detected chromosome abnormalities in 2.9% of cases, which is an incidence similar to that reported (3.1%) in the previous largest review [10]. As expected, the most commonly detected chromosome abnormalities were classical autosomal aneuploidies, which represented 48.1% of the total number of chromosome abnormalities. Among them, trisomy 21 was the most frequent abnormality diagnosed. This was an expected finding, as trisomy 21 is the autosomal aneuploidy with highest viability and prenatal screening programs are basically focused on its detection. Of the sex chromosome aneuploidies, monosomy X was the most commonly detected abnormality, probably due to the fact that it is the only sex chromosome aneuploidy associated with ultrasound findings.

In relation to the frequency of chromosome abnormalities according to the different referral reasons, the indication with the highest PPV was, as expected, parental chromosome rearrangements, as they are associated with high probabilities of being transmitted in both balanced and unbalanced forms. Excluding this indication, the referral reasons with highest detection rates for chromosome abnormalities were increased NT and ultrasound abnormalities, which indicate that ultrasound examination plays a very important role in the prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. Previous studies revealed that the indication with a highest PPV was ultrasound abnormalities [10,16–18]. This is consistent with our data, as those previous studies did not evaluate NT as an independent referral reason. It is worth mentioning that we have detected chromosome abnormalities in 6.6% of cases with ultrasound abnormalities, which is a lower incidence than that obtained by other groups. For example, Nicolaides et al. reported a detection rate of 14% for chromosome abnormalities in fetuses with congenital defects [7]. These differences can probably be explained by different selection criteria. While Nicolaides et al. only included in the category ‘ultrasound abnormalities’ fetuses with fetal malformations, growth retardation, or both; we included a broader spectrum of abnormalities: fetal and placental malformations, abnormal amniotic fluid volume and intrauterine growth restriction. We have not, however, considered increased nuchal translucency as an ultrasound abnormality, which has also reduced the PPV for ultrasound abnormalities.

On the other hand, in this study we separated increased NT and choroid plexus cysts from ultrasound abnormalities because they are considered as ultrasound markers (not ultrasound abnormalities), and we wanted to evaluate their PPV independently. The measurement of the NT during the first trimester of pregnancy has been progressively implemented in routine obstetric practice in our country since 2005 and, analyzing its PPV during the period 2005–2009, it constitutes the indication with the highest detection rate for chromosome abnormalities. As a result, both ultrasound

abnormalities and increased NT are excellent indications for fetal chromosome abnormality. In relation to choroid plexus cysts, this ultrasound marker related to trisomy 18 does not seem to have a high diagnostic value. Nowadays, first trimester prenatal screening also assesses the risk for trisomy 18, and the detection of this ultrasound marker increases the initial risk for such trisomy tenfold. Only when the screening becomes positive is an invasive procedure offered. It is also important to highlight that ‘previous aneuploidy’ is still an important indication for amniocentesis (PPV 3.7%). Some patients suffer repeat aneuploidy in successive pregnancies, probably due to genetic factors related to meiotic division, as previously reported [19]. On the other hand, it is worth mentioning that the relatively low PPV value obtained for positive prenatal screening is probably due to the fact that this indication mainly includes second trimester prenatal screenings, which are not as selective as first trimester prenatal screenings.

Our data also reveal that depending on the chromosome abnormality diagnosed, the distribution of indications changes substantially. Positive prenatal screening and advanced maternal age were the most common referral reasons for the detection of classical autosomal aneuploidies, which is consistent with the fact that prenatal screenings have been basically designed for the detection of trisomy 21, and when such screenings did not exist, advanced maternal age was the only parameter known to be associated with Down syndrome. By contrast, ‘ultrasound abnormalities’ was the main indication in cases of monosomy X, triploidy, unbalanced chromosome rearrangements and rare trisomies. It was expected that ‘ultrasound abnormalities’ constituted the most common indication for the detection of monosomy X and triploidies, as such chromosome abnormalities are usually associated with severe fetal phenotypic repercussions, but the fact that this was also the main referral reason for the detection of unbalanced chromosome rearrangements and rare trisomies is especially relevant. It is well known that most chromosome imbalances entail a postnatal phenotypic repercussion, including mental retardation and congenital abnormalities, but our data also seem to indicate that such unbalanced chromosome rearrangements and rare trisomies are associated with prenatal ultrasound findings.

In conclusion, we present the largest series of cytogenetic studies on amniotic fluid samples in Spain, and our data confirm that performing the karyotype on amniotic fluid samples is a reliable method for the detection of fetal chromosome abnormalities. Increased nuchal translucency and ultrasound abnormalities are among the best indications for the detection of chromosome abnormalities during pregnancy, not only for the diagnosis of Down syndrome but also for the diagnosis of other complex chromosome abnormalities which raise unique genetic counseling issues.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

Acknowledgements

This work has been partially supported by grants PI05/0096 (IP: A. Soler) and PI07/0385 (IP: A. Sánchez), from Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

References

- [1] Steele MW, Breg Jr WR. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet* 1966;1(7434):383–5.
- [2] Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol* 2003;51(3):156–60.

- [3] Benn PA, Egan JF, Fang M, Smith-Bindman R. Changes in the utilization of prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2004;103(6):1255–60.
- [4] Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor JM. Combined ultrasound and biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester: a Scottish multicentre study. *BJOG* 2002;109(6):667–76.
- [5] Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farre MT, Goncè A, Sanchez A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 2004;24(7):541–5.
- [6] Borrell A, Costa D, Delgado RD, Fuster JJ, Soler A, Cararach J, et al. Transcervical chorionic villus sampling beyond 12 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996;7(6):416–20.
- [7] Nicolaides KH, Snijders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet* 1992;340(8821):704–7.
- [8] Verma RS, Babu A. Tissue culture techniques and chromosome preparation. *Human chromosomes principles and techniques*, 2nd ed., New York: McGraw-Hill Press; 1995.
- [9] Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press; 2004. p. 233–46.
- [10] Han SH, An JW, Jeong GY, Yoon HR, Lee A, Yang YH, et al. Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med* 2008;28(5):378–85.
- [11] Simpson NE, Dallaire L, Miller JR, Siminovich L, Hamerton JL, Miller J, et al. Prenatal diagnosis of genetic disease in Canada: report of a collaborative study. *Can Med Assoc J* 1976;23:739–48.
- [12] Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. *JAMA* 1976;236:1471–6.
- [13] Kim HJ, Lee SM, Kim EJ, Cho EN, Park SY, Kang KH, et al. A review of prenatal cytogenetic analysis in 2942 midtrimester amniocentesis. *Korean J Obstet Gynecol* 2001;44:1109–14.
- [14] Clusellas N, Moreno C, Coll MD. Diagnóstico citogenético prenatal en Cataluña durante 10 años (1986–1995). *Prog Diag Prenat* 2002;14(2):40–9.
- [15] Park IY, Shin JC, Kim SC, Ahn HY, Moon HB, Park CH, et al. Cytogenetic analysis in 3,503 cases of midtrimester amniocentesis: CUMC experience (II). *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47:96–103.
- [16] Karaoguz MY, Bal F, Yakut T, Ercelen NO, Ergun MA, Gokcen AB, et al. Cytogenetic results of amniocentesis materials: incidence of abnormal karyotypes in the Turkish collaborative study. *Genet Couns* 2006;17(2):219–30.
- [17] Jang SK, Choi OH. Cytogenetic and clinical analysis in 3537 cases of mid-trimester amniocentesis. *Korean J Perinatol* 2007;18:29–36.
- [18] Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, Chen MH, Ho ES. Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995–2004. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006;45:39–41.
- [19] Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet* 2004;75(3):376–85.

2. Aplicació de la tècnica MLPA subtelomèrica en fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, i en fetus amb anomalies cromosòmiques de difícil caracterització per citogenètica convencional.

Article: “**Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis?**”

Publicat a: Prenatal Diagnosis 2010;30(12-13):1165-9.

Autors: Irene Mademont-Soler, Carme Morales, Jordi Bruguera, Irene Madrigal, Núria Clusellas, Ester Margarit, Aurora Sánchez, Anna Soler.

Resum:

En el moment de realització d'aquest treball, estudis postnatsals havien demostrat una forta contribució de les anomalies cromosòmiques críptiques de les regions subtelomèriques en l'etiologia del retard mental i altres anomalies congènites d'origen desconegut. Amb l'objectiu de determinar la freqüència d'aquestes reorganitzacions cromosòmiques en fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, s'estudiaren mitjançant MLPA subtelomèrica 229 gestacions d'aquestes característiques. En aquest grup de gestacions, l'MLPA revelà 2 desequilibris subtelomèrics clínicament rellevants (deleció 14qter i deleció 20pter) i una anomalia subtelomèrica de significat clínic incert (duplicació X/Ypter). Per tant, la taxa de detecció de desequilibris subtelomèrics críptics obtinguda va ser

del 1,3%; tot i que únicament la deleció 14qter sembla poder correlacionar-se amb les anomalies ecogràfiques observades. D'altra banda, també es realitzà MLPA subtelomèrica per a precisar el diagnòstic de 5 anomalies cromosòmiques de difícil caracterització per citogenètica convencional, i en tots els casos aquesta tècnica va contribuir a la seva correcta caracterització. Els resultats obtinguts indiquen que l'MLPA subtelomèrica no és una eina fonamental per a l'estudi de gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal; però sí que és de gran utilitat per a la caracterització d'anomalies cromosòmiques citogenèticament visibles.

Article: “Prenatal diagnosis of two different unbalanced forms of an inherited (Y;12) translocation”

Publicat a: American Journal of Medical Genetics Part A 2009;149A(12):2820-3.

Autors: Irene Mademont-Soler, Carme Morales, Irene Madrigal, Ester Margarit, Jordi Bruguera, Núria Clusellas, José María Martínez, Antoni Borrell, Aurora Sánchez, Anna Soler.

Resum:

Diversos estudis han reportat la utilitat de les tècniques de citogenètica molecular per a la caracterització de reorganitzacions cromosòmiques, tant durant l'etapa prenatal com postnatal. En aquest treball es descriuen dues gestacions consecutives d'una mateixa parella amb una translocació (Y;12) desequilibrada en què els estudis d'MLPA van ser fonamentals per al diagnòstic prenatal, i es discuteixen les correlacions genotip-fenotip. El cariotip del primer fetus, que presentava una malformació cardíaca estructural, va revelar un cromosoma 12 anòmal, amb una banda extra a 12qter. L'MLPA subtelomèrica va indicar que l'anomalia observada consistia en una monosomia de la regió 12qter i trisomia de la regió pseudoautosòmica 2 dels cromosomes sexuals. L'anàlisi dels progenitors va posar de manifest que l'anomalia cromosòmica fetal era el resultat de l'herència en forma desequilibrada d'una translocació paterna semicríptica t(Y;12)(q12;q24.33). El segon fetus, que no

presentava anomalies ecogràfiques en primer trimestre, va revelar un cariotip masculí aparentment normal. No obstant, aquest fetus havia de ser portador, obligatòriament, del der(Y) patern; i així ho van confirmar els estudis d'MLPA. Per tant, aquest segon fetus presentava la forma desequilibrada alternativa de la translocació. Malgrat que en ambdues gestacions s'esperarien anomalies congènites durant l'etapa postnatal, que inclourien retard mental; és important remarcar que en el primer fetus resulta difícil establir una associació genotip-fenotip, i el segon fetus no presentava anomalies ecogràfiques en primer trimestre, indicant que aquests desequilibris cromosòmics poden no associar-se a troballes ecogràfiques fetals, dificultant el seu diagnòstic durant l'etapa prenatal.

Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis?

Irene Mademont-Soler¹, Carme Morales^{1,2}, Jordi Bruguera³, Irene Madrigal², Núria Clusellas^{1,2}, Ester Margarit^{1,2,4}, Aurora Sánchez^{1,2,4} and Anna Soler^{1,2,4*}

¹Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

³Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁴Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Objective To evaluate the usefulness of subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in both the detection of subtelomeric rearrangements in fetuses with ultrasound abnormalities and normal karyotype, and the characterization of cytogenetically detectable rearrangements.

Method We studied by subtelomeric MLPA 229 pregnancies with ultrasound findings and normal karyotype (Group 1) and five pregnancies with a cytogenetically visible but not microscopically characterizable rearrangement (Group 2). The detected imbalances were confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and parents were also studied.

Results In Group 1, two clinically relevant subtelomeric imbalances (14qter deletion and 20pter deletion) and one subtelomeric imbalance of uncertain significance (X/Ypter duplication) were diagnosed, showing a detection rate of cryptic subtelomeric imbalances in these pregnancies of 1.3%. However, only 14qter deletion seems to be clearly associated with the observed prenatal findings. In Group 2, MLPA contributed to the precise description of the chromosome abnormalities.

Conclusion The low detection rate of subtelomeric imbalances and the poor genotype–phenotype correlations in pregnancies with ultrasound abnormalities and normal karyotype suggest that subtelomeric MLPA is not a crucial tool in the prenatal diagnosis of these cases. However, our work provides evidence that MLPA is very useful for the characterization of unbalanced karyotypes. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: subtelomeric imbalances; prenatal diagnosis; MLPA

INTRODUCTION

Conventional cytogenetics has been the gold standard for the study of fetuses with ultrasound abnormalities and patients with mental retardation and other congenital abnormalities since the 1970s. Although highly reliable, one of the limitations of the conventional karyotype is that imbalances smaller than 5–10 Mb cannot be detected. Recognizing the need for higher resolution techniques, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and micro-array platforms have been developed and introduced to this field to detect such cryptic genomic aberrations (Faas *et al.*, 2008).

Focusing on MLPA, it is a quick, inexpensive and reliable PCR-based technique which enables the screening of up to 50 different genomic regions for numerical aberrations. It has been shown to be a useful tool in clinical genetics, such as in the detection of subtelomeric deletions and duplications.

Postnatal studies have revealed that cryptic imbalances of subtelomeric regions contribute significantly (3–6%) to idiopathic mental retardation and other congenital abnormalities (Ravnan *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2008; Stegmann *et al.*, 2008). Considering these data

from postnatal studies, an involvement of subtelomeric imbalances in prenatal ultrasound abnormalities has been hypothesized too. Several previous studies have been performed to test this hypothesis. Gignac *et al.* studied the presence of subtelomeric rearrangements by FISH in 48 fetuses with major malformations and normal karyotype, and detected clinically relevant subtelomeric rearrangements in two of them (4%) (Gignac *et al.*, 2006). However, Le Caignec *et al.* and Vialard *et al.* used array-comparative genomic hybridization (CGH) platforms to detect genomic imbalances in fetuses with multiple congenital abnormalities and normal karyotype. The first group studied 49 fetuses and identified one *de novo* subtelomeric deletion that was considered to be causative and one familial subtelomeric deletion of uncertain clinical significance, which means a detection rate of 2–4%, whereas Vialard *et al.* performed array-CGH in 37 fetuses and detected clinically relevant subtelomeric rearrangements in two of them (5.4%) (Le Caignec *et al.*, 2005; Vialard *et al.*, 2009). In a similar study, Kleeman *et al.* performed array-CGH in 50 pregnancies with sonographic anomalies and normal karyotype and detected clinically significant copy number alterations in one case (2%), which consisted of mosaic trisomy 22q in amniotic fluid (AF), not previously detected in chorionic villi sample (CVS) karyotype analysis (Kleeman *et al.*, 2009). Independently, Shaffer *et al.* performed array-CGH in 151 prenatal cases with normal karyotype and different indications, of which 110

*Correspondence to: Anna Soler, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: asoler@clinic.ub.es

were referred for abnormal ultrasound findings. Among them, two relevant imbalances were found (both subtelomeric), disclosing a detection rate of subtelomeric imbalances of 1.8% (2/110) (Shaffer *et al.*, 2008).

In this report, we present the largest prenatal screening for subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities and normal karyotype. We also evaluate the usefulness of MLPA technique in both the detection of subtelomeric rearrangements in fetuses with ultrasound abnormalities and normal karyotype, and the characterization of cytogenetically detectable rearrangements.

MATERIALS AND METHODS

Prenatal samples

Two hundred and thirty-four pregnancies were compiled prospectively and classified in two categories. The main group (Group 1) included 229 pregnancies with fetal malformations, intrauterine growth restriction (IUGR), nuchal edema ($> P 99$) and/or other ultrasound markers and normal karyotype. The detailed description of the ultrasound abnormalities diagnosed and the number of cases of each of them are listed in Table 1. When ultrasound examination revealed several abnormal findings, they were classified according to the main abnormality. The second group (Group 2) consisted of five pregnancies with a cytogenetically visible but not microscopically characterizable structural chromosome rearrangement, four of them with ultrasound abnormalities. The unbalanced karyotypes of this group of pregnancies were: 46,XX,add(1)(p36.3), 46,XY,add(3)(p26), 46,XX,add(6)(q27), 46,XX,add(8)(p23.3) and 46,XX,add(12)(q24.33). The case 46,XX,add(12q) has already

Table 1—Description of the ultrasound findings of the 229 cases with normal karyotype (Group 1)

Main indication	Number of cases
Heart defect	54
Nuchal edema $> P 99$ /hygroma/hydrops	31
Intrauterine growth restriction	28
Renal/urinary tract malformation	19
Ventriculomegaly	16
Limb malformations	14
Neural tube defect	10
Diaphragmatic hernia	10
Intracranial malformation	7
Pulmonary adenocystic malformation	7
Fetoplacental vascular abnormalities	7
Intra-abdominal and abdominal wall defects	6
Skeletal malformation	6
Facial anomalies	5
Low frequent markers	4
Microcephaly	3
Amniotic fluid alterations	2
Total	229

In the case of several abnormalities, the main indication for the prenatal study was considered.

been published (Mademont-Soler *et al.*, 2009). The collected samples were: 10 CVS, 222 AF samples, 1 fetal blood (FB) sample and in 1 case CVS and AF. In both groups, when termination of pregnancy was performed, ultrasound findings were confirmed and complemented with the information provided by the autopsy.

This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and parents of all fetuses gave their informed consent.

Cytogenetic analysis

Before MLPA, all the 234 prenatal samples were karyotyped according to standard procedures on AF cells, CVS (by semi-direct method and long-term culture) or FB. Twenty G-banded metaphases from each sample were analyzed using G-banding Wright-staining method. If necessary, the karyotypes of the parents were carried out on cultured peripheral lymphocytes.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Genome-wide subtelomeric MLPA analysis was carried out in all the 234 prenatal samples using the commercially available SALSA P036 and P070 kits (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). Parental samples were also studied by MLPA when cryptic imbalances were diagnosed and samples were available. DNA from the samples was extracted following standard methods. For reference, 50 control DNAs were pooled to avoid individual variations and to obtain average normal patterns. The P036 kit was used to detect subtelomeric deletions or duplications, and P070 kit was used to confirm the chromosome abnormalities detected by P036 mix. As both kits analyze the same subtelomeric regions, subtelomeric gains or losses were considered as veritable when they were confirmed by both MLPA kits. Both P036 and P070 mixes contain probes for each subtelomeric region except for the short arms of acrocentric chromosomes. For the latter, target sequences are localized on the subcentromeric region of the q arm, in one of the first genes located close to the centromere. The MLPA DNA detection and quantification were carried out according to the manufacturer's protocol (MRC-Holland). After the multiplex PCR reaction, electrophoresis was performed using the ABI310 genetic analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) with Rox 500 size standard, and results were viewed using GeneMapper software v3.0 (Applied Biosystems). Data from GeneMapper was exported to an Excel file and normalization was achieved by dividing the signal intensity of each probe by the sum of the signal intensities of all peaks in each sample. Later, the obtained value of each peak was divided by the corresponding normalized peak from the pooled control samples. A reduction or increase in the relative signal strength of $>30\%$ was considered as a deletion or duplication of the locus, respectively.

Table 2—Cryptic abnormalities confirmed by both MLPA kits (P036 and P070) in Group 1, composed of 229 pregnancies with ultrasound abnormalities and normal karyotype

Subtelomeric imbalance	Karyotype	Prenatal sample	Ultrasound abnormalities + autopsy supplemental information	Parental studies		
				MLPA	FISH	Outcome
del 14qter	46,XY	AF	Nuchal edema, generalized skin edema, malposition of hands, short long bones, ambiguous genitalia.	Normal	Not performed	TOP
del 20pter	46,XX	CVS	Cardiopathy, cystic hygroma.	Normal	Normal	TOP
dup X/Ypter	46,XY	AF	Severe intrauterine growth restriction.	Not performed	Not performed	Premature, without phenotypical anomalies

AF, amniotic fluid; CVS, chorionic villi sample; TOP, termination of pregnancy; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification.

FISH confirmation

When MLPA P036 and P070 kits revealed a subtelomeric imbalance, FISH analysis using sets of Vysis subtelomeric probes (Vysis, Downers Grove, IL, USA) or MetaSystems Whole Chromosome Painting (WCP) probes (MetaSystems, Altlußheim, Germany) were carried out for confirmation and to study the parents. Slide preparation and hybridization were performed using standard protocols.

RESULTS

In Group 1 of pregnancies, subtelomeric aberrations were detected in 3 of the 229 prenatal cases studied (1.3%): 14qter deletion, 20pter deletion and X/Ypter duplication. Nevertheless, it is important to highlight that only 14qter deletion seems to be clearly associated with the observed prenatal findings. FISH studies confirmed 14qter and 20pter imbalances, but X/Ypter duplication could not be confirmed by this technique, as duplications in tandem are difficult to analyze by FISH. Parental samples were only available for cases 14qter deletion and 20pter deletion. Parental MLPA revealed that both abnormalities were *de novo* in the fetuses. However, parental FISH studies could only be performed in case 20pter deletion, which revealed that this imbalance had not been inherited from a balanced translocation carrier parent. These data, together with the prenatal samples studied, the ultrasound abnormalities (confirmed and complemented by the autopsy information) and the pregnancies outcome, are listed in Table 2.

In Group 2, MLPA revealed subtelomeric imbalances in all the five cases, showing either a single anomaly or an association between a deletion and duplication. The detected subtelomeric imbalances were: 1pter deletion and 1qter duplication (case 46,XX,add(1)(p36.3)), 3pter

deletion and 13qter duplication (46,XY,add(3)(p26)), 6qter deletion (46,XX,add(6)(q27)), 8pter deletion (46,XX,add(8)(p23.3)) and 12qter deletion and X/Ypter duplication (46,XX,add(12)(q24.33)). In all cases, parental karyotypes were obtained, which revealed a balanced rearrangement in case 46,XX,add(8)(p23.3) (the mother presented the karyotype 46,XX,inv(8)(p23q13)) and in case 46,XX,add(12)(q24.33) (the father presented the karyotype 46,XY,t(Y;12)). FISH studies with subtelomeric probes confirmed all the imbalances detected by MLPA, and FISH using WCP8 probe in case 46,XX,add(8)(p23.3) revealed that the abnormal chromosome 8 consisted of a rearrangement involving only chromosome 8. Parental MLPA studies revealed normal results in all cases. This information, the prenatal samples studied, the ultrasound abnormalities (together with the autopsy supplemental information) and the pregnancies outcome are listed in Table 3.

DISCUSSION

In this report, we present the largest prenatal screening for subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities and normal karyotype and analyze the usefulness of subtelomeric MLPA in these pregnancies. We also evaluate the utility of MLPA technique in the characterization of cytogenetically visible rearrangements.

In the selected population of pregnant women with fetal malformations, IUGR, nuchal edema and/or other ultrasound markers and normal karyotype (Group 1), three imbalances have been diagnosed: 14qter deletion, 20pter deletion and X/Ypter duplication. Consequently, our detection rate of cryptic subtelomeric imbalances has been 1.3% (3/229). By comparing our results with previously published data, our incidence is comparable to that found in the previous largest study, carried out by

Table 3—Characterization of the five cytogenetically visible but not microscopically characterizable structural chromosome rearrangements in Group 2, using MLPA P036 and P070 kits

Karyotype	Subtelomeric imbalance	Prenatal sample	Ultrasound abnormalities + autopsy supplemental information	Parental studies		
				Karyotype	MLPA	Outcome
46,XX,add(1)(p36.3)	del 1pter dup 1qter	AF	Ventriculomegaly	Normal	Normal	Newborn with severe neurological disorder. Death at 1 month.
46,XY,add(3)(p26)	del 3pter dup 13qter	AF	Nuchal edema	Normal	Normal	TOP
46,XX,add(6)(q27) ^a	del 6qter	CVS	No	Normal	Normal	TOP
46,XX ^a		AF				
46,XX,add(8)(p23.3)	del 8pter	AF	Complex heart defect	Mother 46,XX,inv(8) (p23q13)	Normal	TOP
46, XX,add(12)(q24.33)	del 12qter dup X/Yqter	AF	Complex heart defect	Father 46,XY,t(Y;12)	Normal	TOP

AF, amniotic fluid; CVS, chorionic villi sample; TOP, termination of pregnancy; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification.

^a Abnormal karyotype confined to placenta (46,XX in amniocytes), but subtelomeric imbalance present in both CVS and AF.

Shaffer *et al.*, who reported 1.8% of subtelomeric imbalances when using a broad selection criteria (similar to that used in our study). Our detection rate is also similar to that found in the study performed by Le Caignec *et al.*, which is 2% when only clearly clinically relevant imbalances are considered. However, our incidence of clinically relevant cryptic subtelomeric imbalances is slightly different to that found in the studies of Gignac *et al.* (4%), Vialard *et al.* (5.4%) and Kleeman *et al.* (0%) (Le Caignec *et al.*, 2005; Gignac *et al.*, 2006; Shaffer *et al.*, 2008; Kleeman *et al.*, 2009; Vialard *et al.*, 2009).

In relation to the selection criteria, all the previous studies but the one performed by Shaffer *et al.* were very restrictive, considering only cases of major malformations or multiple congenital abnormalities. We used broader selection criteria, also based on ultrasound findings, as considering data from postnatal studies we expected that cryptic subtelomeric imbalances would give a wide range of prenatal findings, from no ultrasound findings or subtle markers to multiple congenital abnormalities (Stegmann *et al.*, 2008; Mademont-Soler *et al.*, 2009). Interestingly, comparing our detection rate with the previously reported incidences, it seems that the selection criteria do not modify considerably the results obtained.

Although the detection rate of subtelomeric imbalances in our selected population of pregnant women has been 3/229, it is important to highlight that only one of these imbalances can be clearly associated with the observed prenatal findings, as it will be discussed subsequently. These results seem to indicate that neither fetal malformations nor ultrasound markers or IUGR are generally predictors of clinically relevant subtelomeric imbalances.

In relation to genotype–phenotype correlations of the three imbalances detected in Group 1, 14qter deletion and 20pter deletion have been considered as clinically

relevant, whereas the clinical significance of X/Ypter duplication is uncertain. Patients with 14qter deletions present recurrent postnatal features, but major congenital malformations are relatively uncommon. Prenatal findings have been reported in some cases and include nuchal edema, generalized skin edema, ambiguous genitalia, IUGR and/or hypoplastic corpus callosum. The ultrasound examination of our 14qter deletion case revealed nuchal edema, generalized skin edema, hands malposition, short long bones and ambiguous genitalia (possible hypospadias). As most of these features have been previously described for 14qter deletions, we consider that the observed prenatal findings are presumably due to such imbalance (van Karnebeek *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2008).

In relation to 20pter deletion case, the few previously reported patients with cryptic 20pter deletions share developmental disabilities in association with dysmorphic features, growth delay, hypotonia and/or kidney hypoplasia. Manuscripts reporting prenatal findings for 20pter deletions have not been previously published. We do not know to what extent the ultrasound findings of our case (cystic hygroma and cardiopathy) can be linked to the 20pter deletion, as cardiopathies have never been previously associated with this imbalance, and cystic hygroma could be a direct consequence of the cardiopathy (Ravnan *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007).

Focusing on X/Ypter duplication, we believe that this chromosome imbalance is not related to the severe IUGR of the fetus. The pregnant woman had pre-eclampsia and the placental size was under third percentile and both abnormalities may explain the IUGR. Furthermore, prenatal findings are not expected for X/Ypter duplications, as such imbalances do not seem to be associated neither with major malformations nor with ultrasound findings (Chagnon *et al.*, 2006; Visootsak *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2008).

In the second group of pregnancies (Group 2), which includes five pregnancies with a cytogenetically visible but not microscopically characterizable structural chromosome rearrangement, MLPA has contributed to the precise characterization of the rearrangement in a short period of time, which is crucial in prenatal diagnosis. In our opinion, these results suggest that MLPA is a highly useful technique for the characterization of unbalanced rearrangements when used as a complement to conventional cytogenetics.

In relation to genotype–phenotype correlations in this second group of pregnancies, they are difficult to establish, as the accurate breakpoints of the microscopically diagnostic rearrangements cannot be established neither by the karyotype nor by MLPA, and in most cases two chromosomes are involved in the rearrangement. Cases 46,XX,add(6)(q27) and 46,XX,add(8)(p23.3) are of particular interest and need special discussion. In the first one, CVS revealed the karyotype 46,XX,add(6)(q27), whereas cytogenetic studies of AF disclosed a normal female karyotype. However, 6qter deletion was detected by MLPA in both samples, suggesting that the initial karyotype of the zygote was 46,XX with a cryptic 6qter deletion. In relation to the case 46,XX,add(8)(p23.3) with a 8pter deletion detected by MLPA, parental karyotyping revealed a pericentric inversion of chromosome 8 in the mother (46,XX,inv(8)(p23q13)). However, the abnormal chromosome 8 of the fetus, which consists of a rearrangement involving only this chromosome according to FISH studies, does not seem to be any of the possible unbalanced recombinants of the maternal pericentric inversion, and has been interpreted as an interstitial inverted duplication of 8p with the concomitant terminal deletion. Consequently, we do not know to what extent the inversion of the mother and the unbalanced karyotype of the fetus can be related.

Finally, we must emphasize that subtelomeric MLPA is not a genome-wide method and only detects imbalances of subtelomeric regions. For the detection of imbalances anywhere along the genome with a higher resolution than conventional cytogenetics, an appropriate technique would be array-based comparative genomic hybridization (aCGH). This method is considered to be very informative for the characterization of chromosome abnormalities and the study of patients with an abnormal phenotype, but their role in prenatal diagnosis is uncertain, above all because of the difficulty in establishing the clinical significance of the detected cryptic imbalances.

In conclusion, our low detection rate of subtelomeric imbalances (1.3%) and the poor genotype–phenotype correlations when such imbalances were detected in a group of 229 pregnancies with ultrasound abnormalities and normal karyotype suggest that subtelomeric MLPA is not a crucial tool in the prenatal diagnosis of these cases. Our results also provide evidence that subtelomeric MLPA is a very useful technique for the characterization of cytogenetically visible but not microscopically characterizable structural chromosome rearrangements.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the cooperation of the families and the technical assistance of the laboratory staff. This work has been partially supported by grants PI05/0096 (IP. A. Soler) and PI07/0385 (IP. A. Sanchez), from Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. We also acknowledge the support from CIBER de Enfermedades Raras, an initiative of the ISCIII, Spain.

REFERENCES

- Cai G, Edelmann L, Goldsmith JE, *et al.* 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Med Genomics* **1**(50): 1–14.
- Chagnon P, Schneider R, Hébert J, *et al.* 2006. Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region I in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **54**(4): 1270–1278.
- Faas BH, Nillesen W, Vermeer S, *et al.* 2008. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet* **51**(6): 511–519.
- Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E. 2006. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations. *Am J Med Genet A* **140A**: 2768–2775.
- Johnson B, Simpson LL. 2007. Screening for congenital heart disease: a move toward earlier echocardiography. *Am J Perinatol* **24**(8): 449–456.
- Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, *et al.* 2009. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* **29**(13): 1213–1217.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, *et al.* 2005. Detection of genomic imbalances by array-based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* **42**: 121–128.
- Mademont-Soler I, Morales C, Madrigal I, *et al.* 2009. Prenatal diagnosis of two different unbalanced forms of an inherited (Y;12) translocation. *Am J Med Genet A* **149A**(12): 2820–2823.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, *et al.* 2006. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* **43**(6): 478–489.
- Schneider A, Benzacken B, Guichet A, *et al.* 2008. Molecular cytogenetic characterization of terminal 14q32 deletions in two children with an abnormal phenotype and corpus callosum hypoplasia. *Eur J Hum Genet* **16**(6): 680–687.
- Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, *et al.* 2008. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* **28**(9): 789–795.
- Shao L, Shaw CA, Lu XY, *et al.* 2008. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study in 5,380 cases. *Am J Med Genet A* **146A**(17): 2242–2251.
- Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. 2008. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet* **51**(2): 93–105.
- van Karnebeek CD, Quik S, Sluijter S, Hulsbeek MM, Hoovers JM, Hennekam RC. 2002. Further delineation of the chromosome 14q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet* **110**(1): 65–72.
- Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, *et al.* 2009. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther* **25**(2): 277–284.
- Visootsak J, Graham JM Jr. 2006. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis* **1**(42): 1–5.

Prenatal Diagnosis of Two Different Unbalanced Forms of an Inherited (Y;12) Translocation

Irene Mademont-Soler,¹ Carme Morales,^{1,2} Irene Madrigal,² Ester Margarit,^{1,2,3} Jordi Bruguera,⁴ Núria Clusellas,^{1,2} José M. Martínez,^{3,5} Antoni Borrell,^{2,3,5} Aurora Sánchez,^{1,2,3} and Anna Soler^{1,2,3*}

¹Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁴Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁵Servei de Medicina Materno-fetal, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Received 15 October 2008; Accepted 25 May 2009

The identification of an unexpected structural chromosome rearrangement at prenatal diagnosis can be problematic and raises unique genetic counseling issues. We describe two consecutive prenatal cases within a family with an inherited unbalanced (Y;12) translocation and discuss the genotype–phenotype correlation. The first fetus presented with 12qter monosomy and pseudoautosomal region 2 trisomy, while the second fetus had the alternative unbalanced state. Although the first fetus had a structural heart defect, such small imbalances might not give sonographic findings, making their prenatal diagnosis difficult. However, congenital abnormalities are expected in both unbalanced forms of the translocation, including mental retardation, which could be explained by the gene dosage variation of *P2RX2*. To our knowledge, these are the first published cases reporting this subtype of (Y;12) translocation, in both balanced and unbalanced states. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Y;autosome translocation; 12qter duplication; 12qter deletion; prenatal diagnosis; genotype–phenotype correlation; cardiopathy; congenital malformations

INTRODUCTION

The identification of an unexpected structural chromosome rearrangement at prenatal diagnosis can be problematic and raises unique genetic counseling issues. Specifically, unbalanced and balanced Y;autosome translocations are rare and constitute a heterogeneous group [Nielsen and Rasmussen, 1976; Alves et al., 2002].

In the majority of cases, there is a nonreciprocal translocation of the heterochromatic region of the long arm of chromosome Y (Yq12) to the short arm of an acrocentric chromosome, most frequently chromosome 15. These translocations have been observed in phenotypically normal individuals and fertility is usually not affected [Hsu, 1994; Alves et al., 2002].

Another group is composed of reciprocal Y;autosome translocations. Balanced reciprocal Y;autosome translocations do not

How to Cite this Article:

Mademont-Soler I, Morales C, Madrigal I, Margarit E, Bruguera J, Clusellas N, Martínez JM, Borrell A, Sánchez A, Soler A. 2009.

Prenatal diagnosis of two different unbalanced forms of an inherited (Y;12) translocation.

Am J Med Genet Part A 149A:2820–2823.

usually have any phenotypic consequences, but often lead to azoospermia, a variety of male gamete abnormalities, and infertility [Hsu, 1994; Delobel et al., 1998; Pinho et al., 2005]. On the other hand, unbalanced Y;autosome translocations have been reported in children with malformations and/or sexual ambiguity owing to deletions, duplications, or rearrangements [Stalvey et al., 1988; Shinohara et al., 1991; Hsu, 1994; Queralt et al., 2008].

Finally, rare forms of Y;autosome translocations are those resulting in an unbalanced 45 chromosome karyotype that includes a dicentric chromosome product of the fusion of chromosome Y and an autosome. These 45,X males could have normal phenotype and fertility, and could transmit the fused Y;autosome chromosome to the offspring in a “new” sex-determining mechanism [Wimmer et al., 2006; Morales et al., 2007].

In this study, we report on the prenatal diagnosis of two different unbalanced states of a paternally inherited (Y;12) translocation. To

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo; Grant numbers: PI07/0385, PI05/0096.

*Correspondence to:

Anna Soler, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: asoler@clinic.ub.es

Published online 16 November 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.33105

our knowledge, this is the first description of a translocation from the long arm of chromosome 12 to the long arm of chromosome Y.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Report

A 31-year-old pregnant woman was referred to our center due to the sonographic finding of hypoplastic left heart in the fetus. The couple was nonconsanguineous and the family history was unremarkable. The poor prognosis of the congenital heart malformation led to a legal termination of pregnancy (TOP) at 21 weeks. Just before the TOP, an amniocentesis was performed for cytogenetic study. As the chromosome analysis in amniotic fluid showed an abnormal karyotype (Fig. 1A.2), extensive cytogenetic analysis of the parents and relatives was subsequently done (see Results Section). A female fetus was delivered with a body length of 25 cm and a weight of 399 g, both in the normal range for the gestational age. External examination of the fetus did not disclose abnormalities. The autopsy confirmed the sonographic findings and revealed a right pulmonary isomerism.

In the next pregnancy, a chorionic villus sampling (CVS) was performed at 11.1 weeks of gestation due to the recurrence risk of unbalanced progeny. Although no sonographic abnormalities were observed, there was an unbalanced inheritance of the translocation (Fig. 1A.3), and a TOP was performed. A male fetus was delivered with a body length of 9.5 cm and a weight of 25 g, both in the normal range for the gestational age. Neither pathological studies nor external examination of the fetus revealed morphologic abnormalities.

Cytogenetic Analysis

Chromosome analysis of the first prenatal case was performed on cultured amniocytes. Twenty G-banded metaphases from two

independent primary cultures were analyzed using G-banding Wright-staining method. For the second pregnancy, the processing of the CVS for cytogenetic analysis was performed by a semi-direct method and by long-term culture to obtain G-banded chromosomes. Twenty metaphases from the semi-direct method and 20 metaphases from the long-term culture were analyzed. The karyotypes of the parents and relatives were carried out on cultured peripheral lymphocytes. A minimum of 15 G-banded Wright-stained metaphases were analyzed from each individual.

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Assay

Genome-wide subtelomeric MLPA analysis was carried out in both pregnancies using the commercially available SALSA PO36B kit (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). For reference, normal DNAs were pooled to avoid individual variations and to obtain average normal patterns. After the multiplex PCR reaction, electrophoresis was performed using the ABI310 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Rox 500 size standard and GeneMapper software v3.0 (Applied Biosystems). Data from GeneMapper was exported to an Excel file and normalization was achieved by dividing the signal intensity of each probe by the averaged signal intensity of all peaks in each sample. Later, each peak was normalized by dividing the obtained average peak by the corresponding average peak from the pooled control samples. A reduction or increase of the relative signal strength of >30% was considered as a deletion or duplication of the locus, respectively.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Analysis

FISH analysis was first carried out using a commercial Whole Chromosome Painting (WCP) probe for chromosome Y and a subtelomeric probe for chromosome 12q (Vysis, Downers Grove, IL) (Fig. 2). To define more accurately the breakpoint at chromosome 12, BAC clones (BACPAC Resources Centre at Children's Hospital Oakland Research Institute) belonging to RPCI-11 and RPCI-13 human BAC library were used. According to the physical and genetic mapping data on chromosome 12 reported in the UCSC Genome Browser database (<http://genome.ucsc.edu>), the selected BAC clones were RP11-1143P18, RP13-820C6, RP13-895J2, RP11-503G7, and RP11-1003C3. Briefly, DNA from each clone was isolated manually and directly labeled with either Spectrum Green-dUTP or Spectrum Orange-dUTP (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) using standard nick translation reaction. Probes were hybridized on preparations of fixed lymphocyte or amniocyte nuclei and metaphases according to standard protocols.

RESULTS

Cytogenetic study of the first fetus revealed an extra dark G-band at 12qter, and the initial proposed karyotype was 46,XX,add(12)-(q24.3) (Fig. 1A.2). Subtelomeric MLPA analysis disclosed monosomy of 12qter and trisomy of Pseudoautosomal Region 2 (PAR2), which is located on the distal long arm of sex chromosomes.

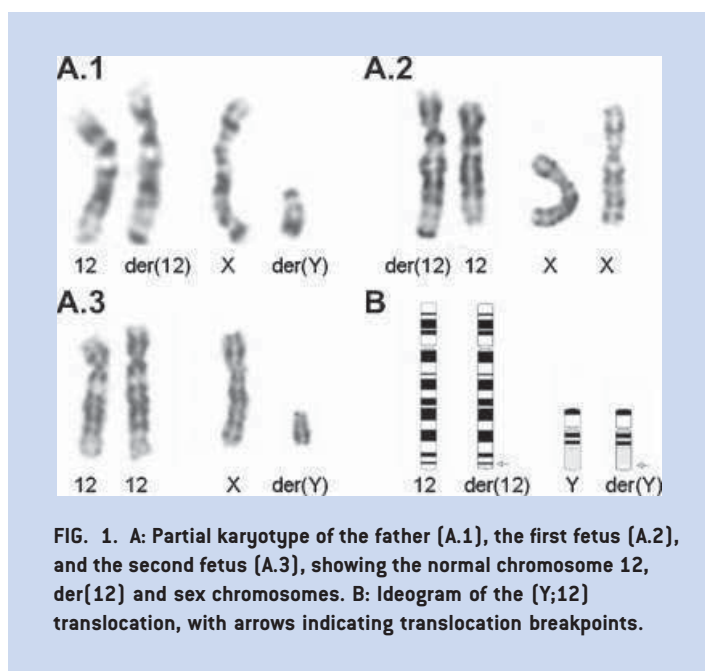


FIG. 1. A: Partial karyotype of the father [A.1], the first fetus [A.2], and the second fetus [A.3], showing the normal chromosome 12, der(12) and sex chromosomes. **B:** Ideogram of the [Y;12] translocation, with arrows indicating translocation breakpoints.

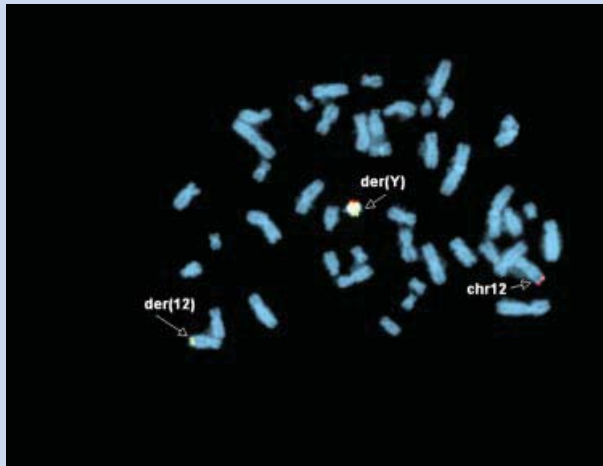


FIG. 2. FISH analysis of the [Y;12] translocation in the paternal sample, showing the hybridization of WCPY (spectrum green) on der(Y) and der(12), and the binding of 12q subtelomeric probe (spectrum orange) to the normal chromosome 12 and der(Y).

Mother's karyotype was normal (46,XX), while father's karyotype was 46,XY,add(12)(q24.3) (Fig. 1A.1). According to MLPA results, a reciprocal balanced translocation involving a cryptic distal fragment of chromosome 12 and a sex chromosome was expected in the father. FISH analysis together with the cytogenetic study disclosed that father's karyotype was 46,XY,t(Y;12)(q12;q24.33) (Figs. 1A.1 and 2), and the karyotype of the first fetus was interpreted as 46,XX,der(12)t(Y;12)(q12;q24.33)pat (Fig. 1A.2). Extensive analysis of the paternal family (his parents and a brother) revealed a de novo origin for the translocation in the father.

In the second pregnancy, the cytogenetic study revealed an apparently normal male karyotype (Fig. 1A.3). However, chromosome Y was necessarily a derivative of chromosome Y with a fragment of chromosome 12, which was confirmed by MLPA. This technique showed 12qter trisomy and monosomy of *PAR2*. Consequently, the karyotype of the second fetus was established as 46,X,der(Y)t(Y;12)(q12;q24.33)pat (Fig. 1A.3).

Fine mapping of the translocation by FISH using BAC clones in the paternal sample revealed the translocated region to span to the most distal 1.3 Mb of 12q, with a breakpoint between the BACs RP11-1143P18 and RP13-820C6. For chromosome Y, the cytogenetic study revealed that the breakpoint was located on heterochromatin region (Yq12).

DISCUSSION

We describe the prenatal diagnosis of two fetuses with different unbalanced forms of a paternally inherited translocation between chromosomes Y and 12. To our knowledge, these are the first published cases reporting this subtype of (Y;12) translocation, in both balanced and unbalanced states.

The karyotypes of the first and second fetus were 46,XX,der(12)t(Y;12)(q12;q24.33)pat (Fig. 1A.2) and 46,X,der(Y)t(Y;12)

(q12;q24.33)pat (Fig. 1A.3), respectively. As a result, the first fetus presented monosomy of 12qter and trisomy of *PAR2*, while the second fetus presented the alternative unbalanced state. However, an aspect to remark is that the karyotype of the second fetus was apparently normal, and its correct characterization could not have been possible without the diagnosis of the first fetus, which disclosed the paternal rearrangement.

As loss or gain of Yq12 band does not cause any phenotypic abnormality [Kühl et al., 2001; Chen et al., 2007], the phenotype and prognosis of these fetuses were expected to be the same as for 12qter deletion and duplication cases.

Fine mapping of the rearrangement revealed that the translocated region of chromosome 12 involved 1.3 Mb of 12q24.33. The deletion and duplication we describe here, with the exception of a <0.4 Mb 12qter duplication [Ruiter et al., 2007], are the smallest reported 12qter imbalances, so the severity of the phenotype and the prognosis of both fetuses remain uncertain. However, postnatal abnormalities, including mental retardation, are expected in both cases because subtelomeric regions are rich in genes and cryptic subtelomeric chromosomal aberrations are recognized as an important cause of congenital abnormalities [Wilkie, 1993; Flint et al., 1995].

The revision of previously published patients with 12qter imbalances supports the idea that congenital abnormalities are expected in both fetuses. Until now only three cases of pure 12qter monosomy have been reported, none of them described in association with a normal phenotype. The most similar case to the first fetus, with a deleted region of 1.6 Mb, was found in a patient with mild mental retardation and congenital malformations [van Karnebeek et al., 2002; Niyazov et al., 2007]. In relation to 12qter trisomy, it is important to mention that a 12q24.33 duplication of less than 0.4 Mb has once been reported in a healthy individual [Ruiter et al., 2007]. However, as all the other reported patients with larger terminal duplications of 12q24.3 presented a variable degree of malformations together with patterns of dysmorphisms and mental retardation [Tajara et al., 1985; Masuno et al., 1987; Speleman et al., 1993; Ireland et al., 2004], congenital abnormalities are also expected in the second fetus.

According to Ensembl database, the translocated region of chromosome 12 contains at least 22 known genes. One of these genes is *P2RX2* (purinergic receptor P2X2 isoform I), which encodes receptors that are expressed in neurons and play an important role in facilitating and modulating fast excitatory and inhibitory synaptic transmission [Tozaki-Saitoh et al., 2006]. Accordingly, its gene dosage variation might be implicated in the mental retardation observed in the similar reported cases.

The heart defect of the first fetus is difficult to link to 12qter monosomy as all the other cases with 12qter deletions lack this major malformation and no genes related to heart have been found in this region. Although the possibility of an association between the chromosome abnormality and the malformation cannot be completely excluded, the heart defect could be independent of the rearrangement.

In relation to the fertility of the father, it is widely known that balanced reciprocal translocations involving chromosome Y can lead to infertility due to an abnormal pairing of chromosomes X and

Y at meiosis [Hsu, 1994; Delobel et al., 1998; Giltay et al., 1998; Pinho et al., 2005; Morales et al., 2007; Queralt et al., 2008], or to the breakpoint being within the azoospermia factor (AZF) locus at Yq11 [Vogt et al., 1996; Brisset et al., 2005]. However, in the reported family the breakpoint is at Yq12 and abnormal pairing of sex chromosomes does not occur as the father is fertile [Kühl et al., 2001; Gardner and Sutherland, 2004].

In conclusion, the cases we present here illustrate the possible unbalanced states of an inherited (Y;12) translocation, which might be probably associated with congenital abnormalities including mental retardation without fetal sonographic findings, making their prenatal diagnosis difficult. There is a great need for additional cases to be reported so that more can be learned about the prognosis and clinical significance of such imbalances, contributing directly to prenatal genetic counseling.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the cooperation of the family, and the technical assistance of the laboratory staff. This work has been partially supported by grants PI07/0385 (IP. A.Sanchez) and PI05/0096 (IP. A.Soler) from Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo.

REFERENCES

- Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. 2002. Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: Cytogenetic and molecular studies. *Eur J Hum Genet* 10:467–474.
- Brisset S, Izard V, Misrahi M, Aboura A, Madoux S, Ferlicot S, Schoevaert D, Soufir JC, Frydman R, Tachdjian G. 2005. Cytogenetic, molecular and testicular tissue studies in an infertile 45,X male carrying an unbalanced (Y;22) translocation: Case report. *Hum Reprod* 20:2168–2172.
- Chen Y, Chen G, Lian Y, Gao X, Huang J, Qiao J. 2007. A normal birth following preimplantation genetic diagnosis by FISH determination in the carriers of der(15)t(Y;15)(Yq12;15p11) translocations: Two case reports. *J Assist Reprod Genet* 24:483–488.
- Delobel B, Djelati R, Gabriel-Robez O, Croquette MF, Rousseaux-Prevost R, Rousseaux J, Rigot JM, Rimpler Y. 1998. Y-autosome translocation and infertility: Usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum Genet* 102:98–102.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132–140.
- Gardner RJ, Sutherland GR. 2004. Chromosome abnormalities and genetic counselling. New York: Oxford University Press. pp 264–293.
- Giltay JC, Tiemessen CH, van Inzen WG, Scheres JM. 1998. One normal child and a chromosomally balanced/normal twin after intracytoplasmic sperm injection in a male with a de-novo t(Y;16) translocation. *Hum Reprod* 13:2745–2747.
- Hsu LY. 1994. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53:108–140.
- Ireland JW, Jalal SM, McGrann PS, Lindor NM. 2004. Nonmosaic smallest duplication of 12q24.31-qter: The first reported case. *Am J Med Genet Part A* 128A:305–310.
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W. 2001. Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9:215–222.
- Masuno M, Fukushima Y, Sugio Y, Kuroki Y. 1987. Partial distal 12q trisomy with arachnoid cyst. *Jinrui Idengaku Zasshi* 32:39–43.
- Morales C, Soler A, Bruguera J, Madrigal I, Alsius M, Obon M, Margarit E, Sánchez A. 2007. Pseudodicentric 22;Y translocation transmitted through four generations of a large family without phenotypic repercussion. *Cytogenet Genome Res* 116:319–323.
- Nielsen J, Rasmussen K. 1976. Y/autosomal translocations. *Clin Genet* 9:609–617.
- Niyazov DM, Nawaz Z, Justice AN, Toriello HV, Martin CL, Adam MP. 2007. Genotype/phenotype correlations in two patients with 12q subtelomere deletions. *Am J Med Genet Part A* 143A:2700–2705.
- Pinho MJ, Neves R, Costa P, Ferrás C, Sousa M, Alves C, Almeida C, Fernandes S, Silva J, Ferrás L, Barros A. 2005. Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: A case report. *Hum Reprod* 20:689–696.
- Queralt R, Madrigal I, Vallecillos MA, Morales C, Ballezá JL, Oliva R, Soler A, Sánchez A, Margarit E. 2008. Atypical XX male with the SRY gene located at the long arm of chromosome 1 and 1qter microdeletion. *Am J Med Genet Part A* 146A:1335–1340.
- Ruiter EM, Koolen DA, Kleefstra T, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BC, Brunner HG, Sistermans EA, de Vries BB. 2007. Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. *Clin Genet* 72:362–368.
- Shinohara M, Minowada S, Aso Y, Yamada K, Nakahori Y, Tamura T, Nakagome Y. 1991. A t(Y;15) translocation with a deletion of the proximal Yq in a boy with mixed gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 86:442–444.
- Speleman F, Van Roy N, De Vos E, Hilliker C, Suijkerbuijk RF, Leroy JG. 1993. Molecular cytogenetic analysis of a familial pericentric inversion of chromosome 12. *Clin Genet* 44:156–163.
- Stalvey JR, Erickson RP, Dasouki M, Glover T, Shokir M. 1988. Clarification of chromosomal abnormalities associated with sexual ambiguity by studies with Y-chromosomal DNA sequences. *Cytogenet Cell Genet* 47:140–143.
- Tajara EH, Varella-Garcia M, Gusson AC. 1985. Partial trisomy 12q24.31→qter. *J Med Genet* 22:73–76.
- Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. 2006. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol* 70:319–328.
- van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, Hennekam RC, Hoovers JM. 2002. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: The Amsterdam experience. *J Med Genet* 39:546–553.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933–943.
- Wilkie AO. 1993. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: A general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 53:688–701.
- Wimmer R, Schempp W, Gopinath PM, Nagarajappa CS, Chandra N, Palaniappan I, Hansmann I. 2006. A family case of fertile human 45,X,psu dic(15;Y) males. *Cytogenet Genome Res* 115:94–98.

3. Comparació de les tècniques MLPA específica de cardiopaties i FISH de la regió 22q11.2 per al diagnòstic genètic de fetus amb malformacions cardíques.

Article: “MLPA: a prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects?”

Publicat a: Gene 2012;500(1):151-4.

Autors: Irene Mademont-Soler, Carme Morales, Anna Soler, Núria Clusellas, Ester Margarit, Estefanía Martínez-Barrios, José María Martínez, Aurora Sánchez.

Resum:

Les malformacions cardíques representen una de les anomalies congènites més comunes en nounats i, en conseqüència, no representen una troballa rara durant l'etapa prenatal. En aquells fetus amb anomalies ecogràfiques cardíques en els quals s'ha descartat la presència d'anomalies cromosòmiques microscòpiques, generalment s'estudia per FISH la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2, ja que aquesta és la síndrome microdeleccional més freqüent a la població i generalment s'associa amb defectes cardíacs. Si es descarten les microdeleccions més comunes a 22q11.2, l'etiologia de la cardiopatia generalment roman inexplicada, dificultant el procés d'assessorament genètic. Amb l'objectiu d'avaluar la utilitat en diagnòstic prenatal dels *kits* comercials d'MLPA dissenyats per a l'estudi de la regió 22q11.2 i altres regions del genoma

prèviament associades a cardiopaties sindròmiques, s'han estudiat mitjançant aquests *kits* quatre gestacions amb delecions 22q11.2 conegudes (prèviament diagnosticades per FISH), i 55 gestacions amb fetus amb cardiopatia, cariotip normal i estudi de FISH de la regió 22q11.2 negatiu. Les 4 gestacions amb microdelecions a 22q11.2 conegudes també van ser diagnosticades mitjançant MLPA, corroborant que aquesta és una tècnica fiable per al diagnòstic i caracterització d'aquests casos. Dels 55 fetus amb cardiopatia, cariotip normal i estudi de FISH de la regió 22q11.2 negatiu, en 50 casos es va poder obtenir resultat dels estudis d'MLPA, i en cap d'ells es detectà un desequilibri cromosòmic a les regions analitzades. Amb la finalitat de valorar la possibilitat de reemplaçar la FISH convencional per estudis d'MLPA en el diagnòstic genètic prenatal de malformacions cardíques, s'han comparat ambdues tècniques quant a potencial diagnòstic, temps d'entrega de resultats, taxa de repetició i de no obtenció de resultats, i cost; i els resultats obtinguts suggereixen que la FISH hauria de continuar sent la tècnica d'elecció per a l'estudi de fetus amb anomalies ecogràfiques cardíques i cariotip normal (enfrent de l'MLPA).



Letter to the Editor

MLPA: A prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects?

Irene Mademont-Soler ^a, Carme Morales ^{a,b}, Anna Soler ^{a,b,c}, Núria Clusellas ^{a,b}, Ester Margarit ^{a,b,c}, Estefanía Martínez-Barrios ^d, José María Martínez ^{c,e}, Aurora Sánchez ^{a,b,c,*}

^a Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^d Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^e Servei de Medicina Materno-Fetal, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 4 March 2012

Available online 15 March 2012

Keywords:

Chromosome 22q11.2 deletion syndrome

Cryptic imbalances

Prenatal diagnosis

Congenital heart defects

MLPA

ABSTRACT

Congenital heart defects (CHD) represent the most common birth defects, so they are not a rare finding when performing routine ultrasound examinations during pregnancy. Once chromosome abnormalities have been excluded in a fetus with a CHD, chromosome 22q11.2 deletion is usually investigated by FISH, as it is the most frequent microdeletion syndrome and is generally associated with cardiac malformations. If 22q11.2 microdeletion is ruled out, the etiology of the CHD remains generally unexplained, making familial genetic counseling difficult. To evaluate the usefulness of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) kits designed for the study of 22q11.2 and other genomic regions previously associated with syndromic CHD, we performed MLPA in 55 pregnancies with fetuses presenting CHD, normal karyotype and negative FISH results for 22q11.2 microdeletion, which constitutes the largest prenatal series reported. Definitive MLPA results were obtained in 50 pregnancies, and in this setting such MLPA kits did not detect any imbalance. On the other hand, to compare FISH and MLPA techniques for the study of 22q11.2 microdeletions, we performed MLPA in 4 pregnancies known to have 22q11.2 deletions (by FISH). All four 22q11.2 microdeletions were also detected by MLPA, which corroborates that it is a reliable technique for the diagnosis and characterization of 22q11.2 deletions. Finally, we evaluated the possibility of replacing conventional FISH by MLPA for the prenatal diagnosis of CHD, comparing the diagnostic potential, results delivery times, repetition and failure rates and cost of both techniques, and concluded that FISH should still be the technique of choice for the prenatal diagnosis of fetuses with CHD.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Congenital heart defects (CHD) constitute the most common birth defects, with an incidence of 12 in 1000 live born infants. As a result, CHD are not a rare finding when performing routine ultrasound examinations during pregnancy. The establishment of their etiology may be complicated in some cases, especially in the absence of positive family and pregnancy histories (Wimalasundera and Gardiner, 2004; Bellucco et al., 2010).

Although many cardiac abnormalities are isolated, there is also a significant association with genetic syndromes, including both chromosome abnormalities and monogenic disorders (Pajkrt et al., 2004;

Pierpont et al., 2007). Among fetuses with CHD, the incidence of chromosome abnormalities ranges from 22 to 54% (Bellucco et al., 2010), and the frequency of monogenic disorders is unknown. On the other hand, postnatal studies of large series of children diagnosed with CHD have revealed that in 19.5% of them the cardiac abnormality is associated with a chromosomal disorder or a non-chromosomal syndrome (Stoll et al., 2003). There are more than 750 reported syndromes where CHD can form part of the spectrum of abnormalities, and the subtlety of the associated findings in many of these syndromes renders achieving a definitive prenatal diagnosis very difficult (Pajkrt et al., 2004).

One of the recognizable syndromes that may present with CHD is chromosome 22q11.2 deletion syndrome, which is the most common microdeletion syndrome (1 in 4000 to 1 in 6000 live births). The phenotypic expression of 22q11.2 microdeletions is known to be highly variable, ranging from severe life-threatening conditions (including CHD, absent thymus, hypocalcemia, oropalatal abnormalities, immunologic deficiencies, learning disabilities and psychiatric disorders) to nearly asymptomatic individuals. Cardiac abnormalities are the most commonly observed finding among patients diagnosed with

Abbreviation: aCGH, array-based comparative genomic hybridization; AF, amniotic fluid; CHD, congenital heart defect; FB, fetal blood; FISH, fluorescent in situ hybridization; MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

* Corresponding author at: Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic de Barcelona, Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 99 40; fax: +34 93 227 56 68.

E-mail address: asanchez@clinic.ub.es (A. Sánchez).

chromosome 22q11.2 deletion syndrome, particularly conotruncal defects (Pajkrt et al., 2004; Bretelle et al., 2010).

When conventional cytogenetic analysis reveals a normal karyotype in a fetus diagnosed as having a conotruncal heart defect, it is highly recommended to investigate for the presence of 22q11.2 microdeletion, as previous studies have revealed that 4.7% of fetuses with a conotruncal anomaly and normal karyotype present a deletion of this region (Bretelle et al., 2010). The study of such deletions is usually performed by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) using commercially available probes (TUPLE1 or N25).

Once chromosome abnormalities and chromosome 22q11.2 deletions are ruled out in a fetus with a CHD, its etiology remains generally unexplained. Familial genetic counseling in these cases is especially difficult, as it is not usually possible to distinguish between syndromic and isolated CHD prenatally. However, many efforts are being done nowadays to discover genes and genomic regions associated with cardiac malformations.

In this report, we present the largest prenatal screening for cryptic imbalances in chromosome 22q11.2 and other genomic regions previously associated with syndromic CHD in fetuses with cardiac abnormalities detected by fetal echocardiography and normal karyotype using SALSA MLPA kits P023 and P250. We evaluate the usefulness of these MLPA kits in this selected group of pregnancies and also compare FISH and MLPA techniques for the study of 22q11.2 microdeletions.

2. Materials and methods

2.1. Prenatal samples

A prospective study was conducted including 55 pregnancies with fetuses presenting CHD, normal karyotype, and negative FISH results for chromosome 22q11.2 deletion syndrome using the commercial probe LSI TUPLE1/LSI ARSA (Vysis, Downers Grove, IL, USA). The CHD observed in these fetuses were: complex congenital heart defects (21/55 cases), ventricular septal defects (16/55), aberrant right subclavian artery (11/55), tetralogy of Fallot (4/55), aortic stenosis (2/55), and persistent left superior vena cava (1/55). In 40 of the 55 cases, ultrasound examination did not reveal any other fetal abnormality, and in the remaining 15 cases there was an association with other ultrasound findings.

On the other hand, 4 prenatal cases with known chromosome 22q11.2 deletions (diagnosed by FISH) were also included in the study. All four cases presented a congenital heart defect, including ventricular septal defects (2 cases), tetralogy of Fallot (1 case), and tetralogy of Fallot plus absent pulmonary valve (1 case). The last case also presented other ultrasound findings (renal agenesis and anhydramnios).

Pregnancies were mostly referred after the second trimester ultrasound examination, and gestational ages at diagnosis of the CHD ranged from 16 to 35 + 2 weeks of gestation, with a mean gestational age of 23 + 1 weeks. A detailed echocardiography was performed in all fetuses for confirmation of the CHD.

Conventional cytogenetics, FISH and MLPA studies were performed on amniotic fluid (AF) samples in 58 cases and on fetal blood (FB) in one case.

The present study was approved by the Ethics Committee of the hospital, and only fetuses whose parents signed the informed consent form were included in the study.

2.2. Cytogenetic analysis

All the 59 prenatal samples were karyotyped according to standard procedures on AF or FB cells. Twenty G-banded metaphases from each sample were analyzed using G-banding Wright-staining method.

2.3. FISH study of chromosome 22q11.2 deletion syndrome

FISH analysis of chromosome 22q11.2 deletion syndrome was performed in all the samples using the commercially available probe LSI TUPLE1/LSI ARSA (Vysis). For AF samples, FISH studies were performed on interphase nuclei from uncultured samples. In case of failure, FISH was performed after culture on metaphasic chromosomes. For the FB sample, FISH analysis was performed on metaphasic chromosomes. Parents of fetuses diagnosed as having 22q11.2 microdeletions were also analyzed by FISH when samples were available. Slide preparation and hybridization were carried out according to standard protocols.

2.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

As AF uncultured samples often fail in providing good DNA quality and/or quantity (Armengol et al., 2011; Van Opstal et al., 2009), DNA was extracted from cultured AF (and the fresh FB sample) using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following manufacturer's instructions. MLPA analysis was performed in all the 59 prenatal samples using either the commercially available MLPA kit P023 DiGeorge Syndrome/VCFs or the MLPA kit P250 DiGeorge (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), both focused on the detection of microdeletions and microduplications in 22q11.2 and other genomic regions previously associated with syndromic CHD (with or without other features of 22q11.2 deletion syndrome). In particular, 36 were studied with P023 and 23 with P250. P023 kit contains 39 different probes, including 11 probes on the long arm of chromosome 22 and 28 probes on chromosomes 4q22, 4q24, 4q34, 4q35, 7p15, 8p21, 8p23, 10p12, 10p14, 10p15, 10q23, 17p13 and 18q21. Similarly, P250 kit contains 48 probes, 31 on chromosome 22 and 17 on chromosomes 4q35, 8p23, 9q34, 10p12, 10p14 and 17p13. For each experiment, 3 control DNAs (pool of 50 phenotypically normal individuals) were used. As prenatal samples referred for congenital heart defects do not arrive regularly and their accumulation would mean a delay in diagnosis, we studied the samples upon their arrival (after culture). As a result, one or two samples were analyzed in each experiment. The MLPA DNA detection, quantification and analysis were carried out as reported previously (Mademont-Soler et al., 2010). A reduction or increase of the relative signal strength of >30% was considered as deletion or duplication of the locus, respectively.

3. Results

For the group of 55 pregnancies with fetuses presenting CHD, normal karyotype and negative FISH results for chromosome 22q11.2 deletion syndrome, MLPA gave a definitive result in 50 cases. Among these 50 pregnancies, no imbalances at 22q11.2 or the other genomic regions included in the MLPA kits used were detected. Information about pregnancy outcomes was available in 41 cases. Parents opted for termination of pregnancy in 15 cases, all of them with a severe congenital heart defect. Of the remaining 26 pregnancies known to be continued, 23 resulted in newborns with the prenatally diagnosed CHD and without other congenital abnormalities, and 3 in newborns with multiple congenital abnormalities.

In relation to the 4 pregnancies with 22q11.2 microdeletions previously diagnosed by FISH, MLPA studies revealed that all of them consisted of the typical 3 Mb deletion. Parental samples were available in two cases, and their study by FISH revealed that one case (the one with multiple ultrasound findings) was *de novo*, while the other had been inherited from an undiagnosed affected mother. Parents of the first case opted for termination of pregnancy, and in the second case the pregnancy was continued. The newborn presented the typical facial appearance of chromosome 22q11.2 deletion

Table 1
Comparison of FISH (TUPLE1 probe) and MLPA (P023 and P250 kits) for the study of congenital heart defects diagnosed prenatally.

		FISH	MLPA
Diagnostic potential		Common 22q11.2 microdeletions	Common and uncommon 22q11.2 imbalances + some other genomic imbalances
Reporting time	No culture	5 days	Not tested
	Culture	22 days	28 days
Repetition rate		5.1%	16.9%
Failure rate		0%	8.5%
Cost		€45 ^a	€39 ^a

^a The cost for FISH and MLPA techniques was calculated based exclusively on the cost of reagents. For MLPA, the cost shown is the average cost of performing half of the experiments studying 1 sample and half of the experiments studying 2 samples.

syndrome, and the prenatally diagnosed congenital heart defect was confirmed by postnatal echocardiography.

Ten out of the 59 MLPA analyses performed had to be repeated, and definitive MLPA results could not be obtained for 5 samples (3 for kit P023 and 2 for kit P250). As a result, the repetition and failure rates for MLPA technique in our series were 16.9% and 8.5%, respectively (Table 1).

For FISH studies, in 56 out of 59 cases the results were obtained from uncultured samples. In the remaining 3 cases, FISH had to be repeated after culture (no failures). Thus the repetition and failure rates for FISH were 5.1% and 0%, respectively (Table 1).

In relation to reporting times, the average turn-around-time for FISH from uncultured specimens was 5 days (and 22 days for cultured samples), while for MLPA technique it was 28 days (Table 1).

4. Discussion

In this report, we present the largest prenatal screening using MLPA for the detection of cryptic imbalances in genomic regions previously associated with congenital heart defects in fetuses with cardiac abnormalities, normal karyotype and negative FISH results for chromosome 22q11.2 deletion syndrome. Apart from focusing on the usefulness of MLPA kits P023 and P250 in this selected group of patients, we also compare FISH and MLPA techniques for the diagnosis of chromosome 22q11.2 microdeletions.

The MLPA kits used detected the four 22q11.2 deletion cases previously diagnosed by FISH, which demonstrates that MLPA is a reliable technique for the diagnosis of this microdeletion syndrome, as previously suggested (Fernández et al., 2005; Vorstman et al., 2006; Stachon et al., 2007; Jalali et al., 2008; Yang et al., 2009). The kits used also contributed to the precise characterization of the deletion size. All the fetuses shared the typical 3 Mb hemizygous deletion of 22q11.2. This finding is consistent with the literature, as 90% of patients with chromosome 22q11.2 microdeletions present this microdeletion size (Edelmann et al., 1999). Nevertheless, it is important to highlight that there is not a strict correlation between the deletion size and the severity of phenotypic abnormalities for this microdeletion syndrome (Stachon et al., 2007).

In the selected population of pregnant women with fetuses diagnosed as having cardiac abnormalities by fetal echocardiography, normal karyotype and negative FISH results for chromosome 22q11.2 deletion syndrome (55 cases), definitive MLPA results could be obtained in 50 pregnancies. Among them, neither atypical 22q11.2 imbalances nor deletions or duplications in other genomic regions previously associated with CHD were diagnosed by MLPA kits P023 or P250. These results seem to indicate that cryptic imbalances in the regions included in these kits (with the exception of 22q11.2 microdeletions) are infrequent among fetuses with congenital heart defects.

When evaluating the possibility of replacing conventional FISH with commercial probes by MLPA kits P023 and P250 for the prenatal diagnosis of CHD, several issues need to be addressed, including the diagnostic potential, results delivery time, repetition and failure rates, and cost of each technique. MLPA could potentially diagnose a broader spectrum of abnormalities (Stachon et al., 2007), but imbalances different from the typical 22q11.2 deletion seem to be infrequent. In our setting, the use of MLPA instead of FISH would have not increased the number of diagnosis. On the other hand, FISH can be carried out easily on interphase nuclei from uncultured amniotic fluid samples, while AF uncultured samples often fail in providing good DNA quality and/or quantity (Van Opstal et al., 2009; Armengol et al., 2011), which makes AF culture often indispensable for MLPA studies. As a result, FISH present a shorter reporting time, which we believe is crucial in prenatal diagnosis. Moreover, repetition and failure rates for MLPA are significantly higher than those observed for FISH (16.9% and 8.5% versus 5.1% and 0%, respectively). Failure rate for MLPA in our series is similar to the 10% detected by Armengol et al. (2011). Finally, the cost of MLPA technique is similar to the cost of FISH if only 1 or 2 samples are studied in each experiment (Table 1). Taking into account all these factors, we consider that FISH should still be the technique of choice for the prenatal diagnosis of fetuses with congenital heart defects.

The establishment of the etiology of congenital heart defects diagnosed prenatally is still challenging, and further studies need to be performed to elucidate their genetic basis, which is crucial for genetic counseling. Recently, some groups have focused their research on the utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) for the study of patients with syndromic and non-syndromic CHD of unknown cause, and promising results have been obtained. It has been shown that 17–18% and 10–17% of patients with syndromic and non-syndromic CHD present cryptic chromosome imbalances, respectively (Thienpont et al., 2007; Erdogan et al., 2008; Greenway et al., 2009; Breckpot et al., 2010). However, the diagnostic yield to be expected from aCGH in a prenatal setting is still unclear, as detection rates for cryptic imbalances are highly variable depending on the study, the interpretation of some imbalances is hampered by the existence of copy number variants of unclear clinical significance, and the cost of aCGH is still high (Hillman et al., 2011; D'Amours et al., 2012; Armengol et al., 2011).

In conclusion, our results corroborate that MLPA kits P023 and P250 can accurately detect and determine the size of deletions in the 22q11.2 region. After evaluating the possibility of replacing conventional FISH by these MLPA kits for the prenatal diagnosis of fetuses with congenital heart defects, our results suggest that FISH should still be the technique of choice for this purpose, as MLPA does not seem to increase significantly the number of diagnosis, and is characterized by longer turn-around-times, higher repetition and failure rates, and the cost is similar.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical assistance of the laboratory staff. This work has been partially supported by grants PI07/0385 (IP. A. Sánchez) and PI11/01841 (IP. A. Sánchez), from Instituto de Salud Carlos III (Spain); and jointly financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa (FEDER).

None of the authors have financial interests that might present a conflict of interest.

References

- Armengol, L., Nevado, J., Serra-Juhé, C., Plaja, A., Mediano, C., García-Santiago, F.A., García-Aragónés, M., Villa, O., Mansilla, E., Preciado, C., Fernández, L., Mori, M.A., García-Pérez, L., Lapunzina, P.D., Pérez-Jurado, L.A., 2011. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum. Genet.* **10.1007/s00439-011-1095-5**.

- Bellucco, F.T., Belangero, S.I., Farah, L.M., Machado, M.V., Cruz, A.P., Lopes, L.M., Lopes, M.A., Zugaib, M., Cernach, M.C., Melaragno, M.I., 2010. Investigating 22q11.2 deletion and other chromosomal aberrations in fetuses with heart defects detected by prenatal echocardiography. *Pediatr. Cardiol.* 31 (8), 1146–1150.
- Breckpot, J., Thienpont, B., Peeters, H., de Ravel, T., Singer, A., Rayyan, M., Allegaert, K., Vanhole, C., Eyskens, B., Vermeesch, J.R., Gewillig, M., Devriendt, K., 2010. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J. Pediatr.* 156 (5), 810–817.
- Bretelle, F., Beyer, L., Pellissier, M.C., Missirian, C., Sigaudy, S., Gamorre, M., D'Ercole, C., Philip, N., 2010. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 53 (6), 367–370.
- D'Amours, G., Kibar, Z., Mathonnet, G., Fetni, R., Tihy, F., Désilets, V., Nizard, S., Michaud, J., Lemyre, E., 2012. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. *Clin. Genet.* 81 (2), 128–141.
- Edelmann, L., Pandita, R.K., Spiteri, E., Funke, B., Goldberg, R., Palanisamy, N., Chaganti, R.S., Magenis, E., Shprintzen, R.J., Morrow, B.E., 1999. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum. Mol. Genet.* 8 (7), 1157–1167.
- Erdogan, F., Larsen, L.A., Zhang, L., Tümer, Z., Tommerup, N., Chen, W., Jacobsen, J.R., Schubert, M., Jurkatis, J., Tzschach, A., Ropers, H.H., Ullmann, R., 2008. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J. Med. Genet.* 45, 704–709.
- Fernández, L., Lapunzina, P., Arjona, D., López Pajares, I., García-Gueta, L., Elorza, D., Burgueros, M., De Torres, M.L., Mori, M.A., Palomares, M., García-Alix, A., Delicado, A., 2005. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin. Genet.* 68 (4), 373–378.
- Greenway, S.C., Pereira, A.C., Lin, J.C., DePalma, S.R., Israel, S.J., Mesquita, S.M., Ergul, E., Conta, J.H., Korn, J.M., McCarroll, S.A., Gorham, J.M., Gabriel, S., Altshuler, D.M., Quintanilla-Dieck, L., Artunduaga, M.A., Eavey, R.D., Plenge, R.M., Shadick, N.A., Weinblatt, M.E., De Jager, P.L., Hafler, D.A., Breitbart, R.E., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2009. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat. Genet.* 41, 931–935.
- Hillman, S.C., Pretlove, S., Coomarasamy, A., McMullan, D.J., Davison, E.V., Maher, E.R., Kilby, M.D., 2011. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 37 (1), 6–14.
- Jalali, G.R., Vorstman, J.A., Errami, A., Vijzelaar, R., Biegel, J., Shaikh, T., Emanuel, B.S., 2008. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum. Mutat.* 29 (3), 433–440.
- Mademont-Soler, I., Morales, C., Bruguera, J., Madrigal, I., Clusellas, N., Margarit, E., Sánchez, A., Soler, A., 2010. Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis? *Prenat. Diagn.* 30 (12–13), 1165–1169.
- Pajkrt, E., Weisz, B., Firth, H.V., Chitty, L.S., 2004. Fetal cardiac anomalies and genetic syndromes. *Prenat. Diagn.* 24 (13), 1104–1115.
- Pierpont, M.E., Basson, C.T., Benson Jr., D.W., Gelb, B.D., Giglia, T.M., Goldmuntz, E., McGee, G., Sable, C.A., Srivastava, D., Webb, C.L., American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, 2007. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 115 (23), 3015–3038.
- Stachon, A.C., Baskin, B., Smith, A.C., Shugar, A., Cytrynbaum, C., Fishman, L., Mendoza-Londono, R., Klatt, R., Teebi, A., Ray, P.N., Weksberg, R., 2007. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am. J. Med. Genet. A* 143A (24), 2924–2930.
- Stoll, C., Clementi, M., Euroscan study group, 2003. Prenatal diagnosis of dysmorphic syndromes by routine fetal ultrasound examination across Europe. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 21 (6), 543–551.
- Thienpont, B., Mertens, L., de Ravel, T., Eyskens, B., Boshoff, D., Maas, N., Fryns, J.P., Gewillig, M., Vermeesch, J.R., Devriendt, K., 2007. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur. Heart J.* 28 (22), 2778–2784.
- Van Opstal, D., Boter, M., de Jong, D., van den Berg, C., Brüggewirth, H.T., Wildschut, H.L., de Klein, A., Galjaard, R.J., 2009. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur. J. Hum. Genet.* 17 (1), 112–121.
- Vorstman, J.A., Jalali, G.R., Rappaport, E.F., Hacker, A.M., Scott, C., Emanuel, B.S., 2006. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum. Mutat.* 27 (8), 814–821.
- Wimalasundera, R.C., Gardiner, H.M., 2004. Congenital heart disease and aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 24 (13), 1116–1122.
- Yang, C., Zhu, X., Yi, L., Shi, Z., Wang, H., Hu, Y., Wang, Y., 2009. Comparative study of three PCR-based copy number variant approaches, CFMSA, M-PCR, and MLPA, in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 13 (6), 803–808.

4. Potencial diagnòstic de la CMA en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques.

Article: “Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis”

Publicat a: Ultrasound in obstetrics and gynecology 2013;41(4):375-82.

Autors: Irene Mademont-Soler, Carme Morales, Anna Soler, José María Martínez-Crespo, Yiping Shen, Ester Margarit, Núria Clusellas, María Obón, Bai-Lin Wu, Aurora Sánchez.

Resum:

El paper que han de jugar les tècniques de CMA en diagnòstic prenatal encara no està ben definit, però diversos estudis indiquen que la seva utilització en gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal incrementaria la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques. Amb l'objectiu d'avaluar el potencial diagnòstic de la CMA en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques, s'ha realitzat un anàlisi retrospectiu de les anomalies detectades per citogenètica convencional i FISH de la regió 22q11.2 en els 276 fetus amb troballes ecogràfiques cardíques referits entre 2009 i 2011 a l'Hospital Clínic de Barcelona; i s'ha realitzat CMA en 51 dels fetus amb troballes cardíques, cariotip normal, i estudi negatiu (o sense estudi) de la Sd. de la deleció cromosòmica 22q11.2. La freqüència observada d'anomalies cromosòmiques microscòpiques i de microdeleccions a 22q11.2 ha estat del 15,9% (44/276) i del 6,4% (5/78),

respectivament. Dels 51 fetus en què es realitzà CMA, la taxa de detecció de CNVs patogèniques no diagnosticades per citogenètica convencional va ser del 2%, i no es detectà cap variant de significat clínic incert. També s'estudià mitjançant CMA l'únic fetus amb cardiopatia i una reorganització cromosòmica aparentment equilibrada *de novo* diagnosticat durant el període avaluat, i en aquest cas la CMA va revelar que l'alteració no era realment equilibrada. Els resultats obtinguts indiquen que si es realitzés CMA com a complement als estudis citogenètics convencionals en aquells fetus amb troballes ecogràfiques cardíques, s'incrementaria un 2% la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques. D'altra banda, si les 276 gestacions de la sèrie presentada s'haguessin estudiat mitjançant CMA (enlloc de cariotip), totes les anomalies cromosòmiques clínicament rellevants diagnosticades per citogenètica convencional, excepte 3 triploïdies, s'haguessin detectat. Amb l'objectiu de no perdre les triploïdies, i també d'evitar utilitzar CMA per al diagnòstic de les aneuploïdies més comunes, seria recomanable descartar-les mitjançant una tècnica ràpida i econòmica (p.e. QF-PCR) abans dels estudis de CMA. Utilitzant aquesta estratègia en la nostra sèrie, s'haguessin detectat totes les anomalies clínicament rellevants diagnosticades al cariotip, els casos amb microdeleccions a 22q11.2, i s'hagués incrementat un 2% la taxa de detecció d'alteracions cromosòmiques. Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que la CMA podria ser una alternativa molt atractiva al cariotip convencional en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques.

Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis

I. MADEMONT-SOLER*, C. MORALES*†, A. SOLER*†‡, J. M. MARTÍNEZ-CRESPO‡§, Y. SHEN¶, E. MARGARIT*†‡, N. CLUSELLAS*†, M. OBÓN**, B.-L. WU¶ and A. SÁNCHEZ*†‡

*Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; †CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain; ‡Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; §Servei de Medicina Materno-Fetal, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ¶Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital Boston, Boston, MA, USA; **Servei d'Anàlisis Clíniques, Àrea de Genètica, Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Girona, Spain

KEYWORDS: 6q deletion; CHD7 gene; chromosomal microarray-based analysis; chromosome 22q11.2 deletion syndrome; congenital heart defects; karyotype

ABSTRACT

Objectives To assess the frequency of karyotype abnormalities and chromosome 22q11.2 deletion syndrome among fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings, and to evaluate the clinical value of chromosomal microarray-based analysis (CMA) in the study of such pregnancies.

Methods First, we carried out retrospective analysis of karyotype abnormalities and 22q11.2 deletion syndrome cases diagnosed between January 2009 and December 2011 in our center among fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings (n=276). Second, CMA was performed in 51 of the fetuses with such findings, normal karyotype and negative or no 22q11.2 deletion syndrome study, and in the only fetus with a heart defect and an apparently balanced *de novo* chromosomal rearrangement.

Results Out of the 276 pregnancies with abnormal cardiac ultrasound findings, karyotyping revealed a chromosomal abnormality in 44 (15.9%). Of fetuses with normal karyotype in which 22q11.2 deletion syndrome studies were performed, 6.4% (5/78) had this microdeletion syndrome. Among fetuses with abnormal cardiac findings, normal karyotype and negative or no 22q11.2 deletion syndrome study that underwent CMA, the detection rate of pathogenic copy number variants not detected by conventional cytogenetics was 2.0% (1/51), and no variants of uncertain clinical significance were found. In the fetus with a heart defect and an apparently

balanced *de novo* chromosomal rearrangement, CMA revealed that the rearrangement was not truly balanced.

Conclusions In the assessment of genetic abnormalities in pregnancies with abnormal cardiac ultrasound findings, the diagnostic yield may be increased by 2% if CMA is used as a complementary tool to conventional cytogenetics. Our results suggest that CMA could be a good alternative to karyotyping in these pregnancies. Copyright © 2012 ISUOG. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

INTRODUCTION

Congenital heart defects (CHDs) represent one of the most common ultrasound findings in prenatal diagnosis, but knowledge of their genetic basis is still limited. Generally, once chromosomal abnormalities and chromosome 22q11.2 deletion syndrome have been ruled out in a fetus with a CHD, its etiology usually remains unexplained, making familial genetic counseling difficult^{1,2}.

Cytogenetic diagnosis has been revolutionized within the last few years by the development of chromosomal microarray-based analysis (CMA), which enables whole-genome screening for chromosomal imbalances at higher resolution than does conventional karyotyping. CMA is nowadays recommended as the first-line cytogenetic diagnostic test for the study of individuals with developmental disabilities or congenital anomalies; however, for prenatal diagnosis, traditional karyotyping

Correspondence to: Dr A. Sánchez, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular Hospital Clínic de Barcelona, Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain (e-mail: asanchez@clinic.ub.es)

Accepted: 6 December 2012

is still considered the gold standard, essentially because the interpretation of some variants of uncertain clinical significance (VOUS) is still challenging^{3–8}. Nevertheless, several studies indicate that the application of CMA to fetuses with ultrasound abnormalities may significantly improve the diagnosis of genetic abnormalities compared with karyotype testing alone^{9–12}.

Focusing on cardiac malformations, recent studies have demonstrated the usefulness of microarray platforms for the study of this congenital abnormality in a postnatal setting^{13–18}, but limited data are available for this technique in prenatal diagnosis^{12,19–23}.

In this paper, we present one of the largest prenatal series of fetuses with CHD and/or cardiac ultrasound markers and normal karyotype studied by CMA, and evaluate the clinical value of this technique as a prenatal diagnostic tool for the study of such pregnancies.

METHODS

Prenatal samples

During the period January 2009 to December 2011, 3866 pregnant women were referred to Hospital Clínic de Barcelona for karyotyping. This was performed using amniotic fluid ($n = 3802$) or fetal blood ($n = 64$) samples. In 276 cases (272 amniotic fluid and four fetal blood samples), the fetus presented with CHD (205 cases) or cardiac ultrasound marker/s (71 cases), the latter including echogenic intracardiac focus, aberrant right subclavian artery and pericardial effusion. The frequencies for the different types of CHD are given in Table 1. In 113 of the 276 cases (40.9%), ultrasound examination also revealed extracardiac anomalies and/or ultrasound markers. Mean gestational age at invasive procedure was $23 + 2$ (range, 15–38) weeks.

In 85 (83 amniotic fluid, two fetal blood) of the 276 prenatal samples (of which 78 had a normal karyotype), obstetricians requested fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) testing for chromosome 22q11.2 deletion syndrome. The cardiac ultrasound findings most frequently observed in these fetuses were conotruncal heart defects (30/85 cases).

CMA was performed in 51 of the 276 prenatal samples. Cases were prospectively selected according to the following inclusion criteria: fetuses presenting with CHD and/or cardiac ultrasound markers (with or without other ultrasound findings), normal karyotype and negative or no FISH testing for chromosome 22q11.2 deletion syndrome. Furthermore, only cases in which the parents underwent pretest counseling and provided informed consent for participating in the project were included. The cardiac ultrasound findings observed in these fetuses are described in Table 1. Associated extracardiac anomalies and/or ultrasound markers were present in 45.1% of the cases (23/51). Studies were postponed until birth or termination of pregnancy. In addition to these cases, CMA was also performed in the only pregnancy with a fetus

Table 1 Type of cardiac defect in 276 fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings referred for karyotyping and number of microscopic chromosomal abnormalities, with associated positive predictive value (PPV), in these fetuses. Type of cardiac defect in 51 cases that underwent chromosomal microarray-based analysis (CMA) is also given

Cardiac ultrasound finding	n	Microscopic chromosomal abnormalities		Underwent CMA (n)
		n	PPV (%)	
Septal defect	97	16	16.5	14
Conotruncal defect	35	4	11.4	9
Right-heart defect	17	0	0	8
Left-heart defect	27	8	29.6	10
Other heart defect	12	1	8.3	4
Unspecified heart defect*	17	7	41.2	—
Ultrasound marker	71	8	11.3	6
Total	276	44	—	51

*Includes cases for which a precise description of cardiac malformation was unavailable.

presenting with CHD and an apparently balanced *de novo* structural chromosomal rearrangement.

The study received Institutional Review Board approval from the Ethics Committee for Clinical Research of the Hospital Clínic de Barcelona.

Cytogenetic analysis

Prenatal samples were karyotyped according to standard procedures for amniotic fluid or fetal blood cells. When a chromosomal rearrangement was diagnosed, parental karyotype testing was carried out on peripheral blood lymphocytes to determine whether the rearrangement was *de novo* or inherited. Twenty G-banded metaphases from each sample were analyzed using the G-banding Wright-staining method.

FISH study of chromosome 22q11.2 deletion syndrome

FISH analysis of chromosome 22q11.2 deletion syndrome was performed on interphase nuclei or metaphase chromosomes using the commercial probe LSI TUPLE1/LSI ARSA (Vysis, Downers Grove, IL, USA). Parents of fetuses diagnosed as having this microdeletion syndrome were also studied by FISH. Slide preparation and hybridization were carried out according to standard protocols.

CMA

Fetal DNA was obtained from cultured amniotic fluid or fetal blood cells using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and subjected to array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) analysis using the commercially available platform CytoChip Focus Constitutional (BlueGnome, Cambridge, UK), following the protocols stipulated by the manufacturer. This microarray platform enables the investigation of 139 disease-specific loci at 100-kb resolution and screening

of the genomic backbone at 1-Mb resolution. Fetal DNA and sex-matched reference samples were labeled with fluorescent Cy5 and Cy3 dyes in dye-swap experiments. After hybridization, the slides were scanned with an Agilent scanner G2565BA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and results were analyzed using BlueFuse Multi software (BlueGnome).

Detected copy number gains or losses were systematically evaluated for clinical significance by comparing them with those in the scientific literature and the following publicly available databases: Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>), ISCA (<https://www.iscaconsortium.org/>), ECARUCA (<http://www.ecaruca.net>) and OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Alterations coinciding with known polymorphic copy number variants (CNVs) were interpreted as benign and not reported. Otherwise, CNVs identified in regions of known clinical relevance (i.e. involving microdeletion/microduplication syndrome critical regions) or that comprised genes whose dosage alterations are associated with congenital defects were interpreted as pathogenic. A CNV that did not fit any of the above criteria was considered a VOUS.

The only genomic rearrangement detected by CytoChip Focus Constitutional (BlueGnome) was confirmed and accurately characterized using SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit 4x180K (Agilent Technologies), following the manufacturer's instructions. This platform was also used to study the fetus with a CHD and an apparently balanced *de novo* structural chromosomal rearrangement. This microarray platform contains oligonucleotide probes for the detection of CNVs with an overall median probe spacing of 25.3 kb (5 kb in ISCA regions), and probes for the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Case DNA was labeled with Cy5, and gender-matched reference DNA labeled with Cy3 was used as a control. Images were captured with Agilent scanner G2565BA (Agilent Technologies), and Agilent's Genomic Workbench software (Agilent Technologies) was subsequently used for data normalization, quality evaluation and data visualization.

Additional studies

FISH studies using bacterial artificial chromosome (BAC) clones belonging to RPCI-11 human BAC library (BACPAC Chori, CA, USA) were performed in one case to determine the inherited or *de novo* status of the detected CNVs, following previously described protocols²⁴. The selected clones were RP11-91I20 and RP11-92 M10 (both for chromosome 8q).

RESULTS

Among the 276 pregnancies with CHD and/or cardiac ultrasound markers detected on ultrasound examination, conventional karyotyping revealed a chromosomal abnormality in 44 (15.9%) (Figure 1). If only CHDs

are considered, the detection rate increases to 17.6% (36/205). The incidence of chromosomal abnormalities was 6.1% (10/163) in pregnancies with apparently isolated cardiac ultrasound findings and 30.1% (34/113) in those presenting with extracardiac malformations and/or ultrasound markers. Classical autosomal aneuploidies (trisomies 21, 18 and 13) were the most frequent chromosomal abnormalities diagnosed (26/44, 59.1%), followed by structural chromosomal rearrangements (13/44, 29.5%), including four apparently balanced rearrangements (three inherited from phenotypically normal parents and one *de novo*) and nine unbalanced rearrangements. Three triploidies (69,XXX) (3/44; 6.8%) and two sex chromosome aneuploidies (45,X and 47,XXX/46,XX) (2/44; 4.5%) were also diagnosed. The chromosomal abnormalities and ultrasound findings observed in these cases are specified in Table 2. The positive predictive values (PPVs) obtained for the different cardiac ultrasound findings for microscopic chromosomal abnormalities were left-heart defects, 29.6%; septal defects, 16.5%; conotruncal defects, 11.4%; other heart defects, 8.3%; right-heart defects, 0%; and cardiac ultrasound markers 11.3% (Table 1).

Of the 85 fetuses in which chromosome 22q11.2 deletion syndrome studies were performed, seven had an abnormal karyotype. Among the remaining 78 cases, FISH analysis revealed this microdeletion syndrome in five (6.4%) (Figure 1), two of them with a ventricular septal defect and three with a conotruncal defect. Three cases were *de novo*, one inherited from the mother, and one of unknown inheritance (parents unavailable for testing).

Among the 51 pregnancies with CHDs and/or cardiac ultrasound markers, normal karyotype and negative or no FISH study for chromosome 22q11.2 deletion syndrome that underwent array-CGH analysis, an abnormal profile was detected in one case (1/51; 2.0%), and no VOUS were found (Figure 1). The fetus with an abnormal microarray result presented a 14.9-Mb deletion of 6q21q22.31, spanning from position 106,457,140 to 121,353,146 (UCSC Genome Build hg19, Feb. 2009) (Figure 2a). Careful review of the initial karyotype (on a fetal blood sample) revealed that the imbalance was visible (Figure 2a), but went unnoticed owing to low resolution. Parental karyotypes were normal. In this fetus, the second-trimester ultrasound scan revealed tetralogy of Fallot, severe intrauterine growth restriction and bilateral upper limb abnormalities (bilateral radial aplasia and ectrodactyly of both hands). Termination of pregnancy was performed and autopsy confirmed the ultrasound findings.

In the only case with a CHD and an apparently balanced *de novo* chromosomal rearrangement (karyotype 46,XX,t(5;8)(q12;q12)dn) (ultrasound findings described in Table 2), CMA revealed two 8q interstitial deletions, spanning positions 60,921,268 to 63,836,405 and 64,992,164 to 66,207,826 (hg19) (Figure 2b). No additional studies were possible on the fetus, but parental FISH studies revealed that both imbalances were *de novo*. The parents opted for termination of pregnancy, and autopsy confirmed the prenatal findings.

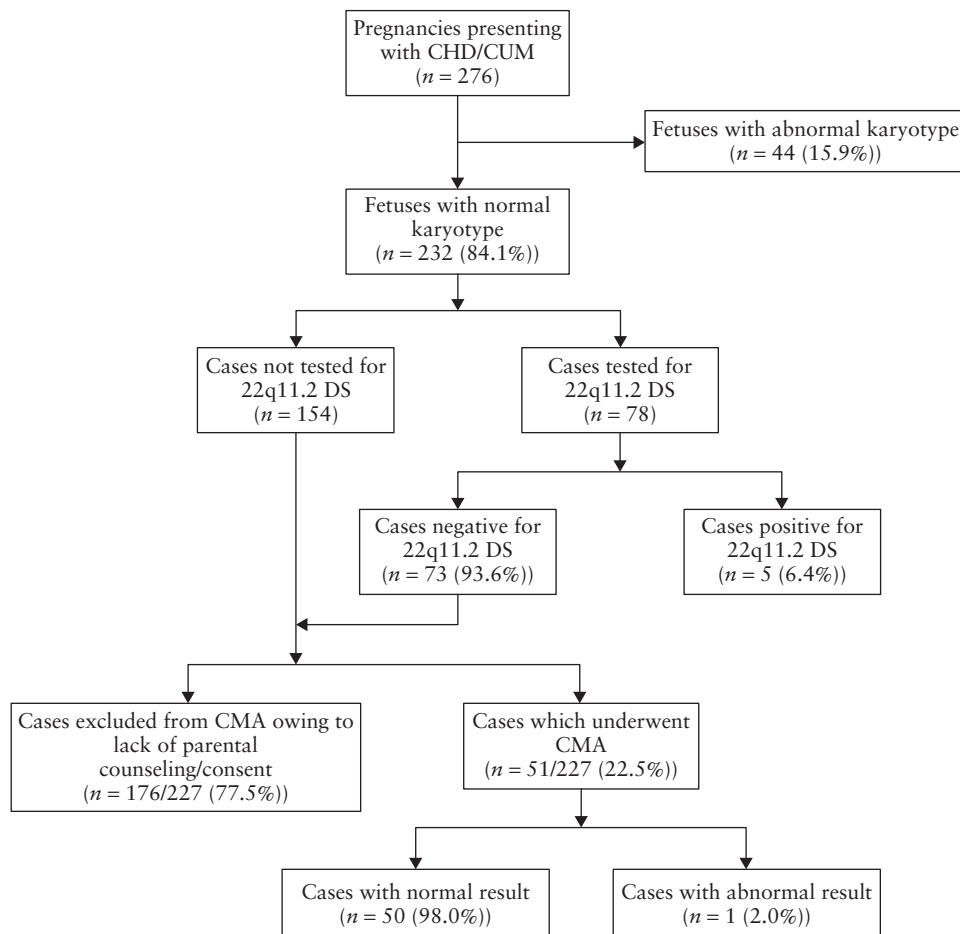


Figure 1 Flowchart of analyses performed in 276 prenatal samples with congenital heart defects (CHD) and/or cardiac ultrasound markers (CUM) included in the study based on analysis of amniotic fluid or fetal blood, comprising conventional karyotyping, fluorescent *in-situ* hybridization for chromosome 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2 DS) and chromosomal microarray-based analysis (CMA).

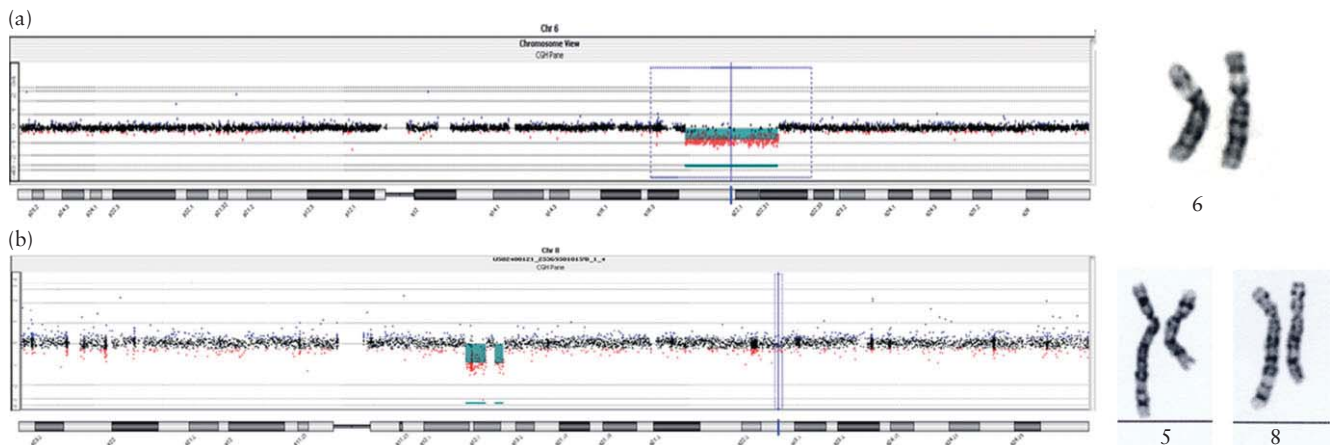


Figure 2 (a) Partial microarray result (left) and karyotype (right) of a fetus with a deletion of 6q21q22.31. (b) Partial microarray result (left) and karyotype (right) of a fetus with a *de novo* translocation between chromosomes 5 and 8.

DISCUSSION

In this report, we present one of the largest prenatal series of fetuses with CHDs and/or cardiac ultrasound markers and normal karyotype studied by CMA, and evaluate the clinical value of this technique as a prenatal diagnostic tool

for the study of such pregnancies. We also investigated the frequency and nature of the cytogenetically visible chromosomal rearrangements and chromosome 22q11.2 deletion syndrome cases detected among fetuses with cardiac ultrasound findings over a 3-year period at our center.

Table 2 Chromosomal abnormalities diagnosed by conventional karyotyping in 276 pregnancies with fetuses presenting abnormal cardiac ultrasound findings

Chromosomal abnormality	n (%)	Cardiac ultrasound findings	Other ultrasound findings
Classical autosomal aneuploidy	26 (59.1)		
Trisomy 21	9	AVSD (4), EIF (2), ARSA (1), ARSA + pericardial effusion (1), unspecified (1)	Six with other ultrasound findings
Trisomy 18	10	VSD (4), AVSD (1), CoA (1), pericardial effusion (1), VSD + CoA (2), unspecified (1)	All 10 with other ultrasound findings
Trisomy 13	7	HLHS (2), VSD + CoA (2), DORV (1), unspecified (2)	All seven with other ultrasound findings
Sex chromosome aneuploidies	2 (4.5)		
45,X	1	AS (1)	None
47,XXX/46,XX	1	EIF (1)	Increased nuchal translucency
Structural chromosomal rearrangement	13 (29.5)		
46,XX,t(5;8)(q12;q12)dn	1	Unbalanced AVSD with HLHS and agenesis of the pulmonary valve	Blake's pouch cyst
46,XX,t(9;19)(p13;p13.3)pat	1	Critical AS	None
46,XX,der(5)t(5;6)(p15.3;p21.3)mat	1	Pericardial effusion	IUGR
46,XY,inv(7)(q11q22)pat	1	VSD	None
46,XY,inv(9)(q21q33.1)pat	1	DORV + HLHS	None
46,XY,del(3)(p12.2p13)dn	1	CoA	Ventriculomegaly + horseshoe kidney + choanal atresia + hypertelorism
46,XX,del(4)(q33)	1	CoA	IUGR + absent ductus venosus + cystic hygroma + strawberry skull + hands and feet malposition + anhydramnios
46,XX,del(6)(p23p24)	1	VSD	Bilateral hydronephrosis
46,XX,del(7)(q11q21.1)	1	Unspecified	None
46,XY,del(21)(q22)dn	1	ARSA + PLSVC + CoA	IUGR + ventriculomegaly + mega cisterna magna + syndactyly
46,X,del(X)(p11.4)	1	ARSA	None
47,XX,+i(9)(p10)	1	Unspecified	Bilateral hydronephrosis + clubfeet + Dandy-Walker malformation + retrognathia + brachydactyly
46,XY,r(3)/46,XY,dup(3)(q?)/45,XY,-3	1	VSD	IUGR + choroid plexus cyst + delayed cortical maturation
Triploidy	3 (6.8)	AVSD (1), ToF (1), unspecified (1)	Two with other ultrasound findings
Total	44 (100.0)		

ARSA, aberrant right subclavian artery; AS, aortic stenosis; AVSD, atrioventricular septal defect; CoA, coarctation of the aorta; DORV, double outlet right ventricle; EIF, echogenic intracardiac focus; HLHS, hypoplastic left heart syndrome; IUGR, intrauterine growth restriction; PLSVC, persistent left superior vena cava; ToF, tetralogy of Fallot; VSD, ventricular septal defect.

The detection rate of chromosomal abnormalities by conventional karyotyping in fetuses with CHDs and/or cardiac ultrasound markers was 15.9% (44/276) (17.6% if only CHDs are considered), and the incidence of chromosome 22q11.2 deletion syndrome among fetuses with normal karyotype tested for the syndrome (at the obstetrician's request) was 6.4% (5/78). Both frequencies are consistent with previously published detection rates (22–56.3% and 5.4%, respectively)^{25–31}, and corroborate the strong association between chromosomal abnormalities and cardiac defects.

According to the PPVs obtained (Table 1), the detection rate of microscopic chromosomal abnormalities strongly depends on the observed cardiac ultrasound finding, being highest for left-heart defects (29.6%). Interestingly, the PPV obtained for right-heart defects was 0%, which seems to indicate that such cardiac malformations are poorly associated with microscopic chromosomal abnormalities. Our results also show that the likelihood of diagnosis of

a chromosomal abnormality increases five-fold with the presence of extracardiac anomalies.

In our series of 51 fetuses with CHDs and/or cardiac ultrasound markers, normal karyotype and negative or no FISH study for chromosome 22q11.2 deletion syndrome that underwent array-CGH testing, the detection rate of pathogenic CNVs not detected by conventional karyotyping was 2.0% (1/51), and no VOUS were found. As mentioned above, microarray analysis revealed a 14.9-Mb deletion of 6q21q22.31 in a fetus with tetralogy of Fallot, severe intrauterine growth restriction and bilateral upper limb abnormalities (Figure 2a). The CNV in this case was *de novo* and considered to be responsible for the fetal phenotype, as the observed abnormalities have been previously described in patients with overlapping 6q deletions³².

Comparison of our results with those of similar studies is difficult, as few data have been published regarding detection rates of chromosomal imbalances by CMA

in fetuses with cardiac malformations. Schmid *et al.*¹⁹ specifically evaluated the usefulness of CMA platforms in fetuses with CHD. In particular, they performed array-CGH in 12 fetuses with CHD, normal karyotype and negative FISH results for chromosome 22q11.2 deletion syndrome, and detected three potentially causal chromosomal imbalances (25.0%), comprising a 15qter deletion of 9 Mb, a 17p duplication of 3.5 Mb and a mosaic trisomy 7¹⁹. These results are significantly different from ours, most probably because of differences in the cohort size and selection criteria of the prenatal samples. On the other hand, most series presenting data on CMA in fetuses with ultrasound abnormalities include pregnancies with CHD, but in general the number of such cases is small and the specific detection rate of chromosomal imbalances among these pregnancies is not reported^{12,20–23,33,34}. An exception is the study performed by Lee *et al.*¹². In their work, among the 3171 pregnancies studied by CMA, 50 presented CHDs, and in seven of them (14.0%) a chromosomal segmental deletion or duplication was detected, this detection rate including both microscopic and cryptic rearrangements¹². However, their study focused on the clinical utility of array-CGH for prenatal diagnosis in general, and further detail on the cases with CHD is not provided.

Our results indicate that if CMA with a targeted platform with genomic backbone at 1-Mb resolution was performed as an adjunct to conventional cytogenetics in pregnancies with abnormal cardiac ultrasound findings, the diagnostic yield for pathogenic chromosomal abnormalities may be increased by 2%, without an increase in results of unclear clinical relevance. However, as performing both techniques may be unfeasible from an economic point of view, discussion is under way amongst the scientific and medical community on whether CMA should replace conventional karyotyping in prenatal diagnosis, and for which referral reasons^{5–8,20–22,33–44}. If the array-CGH platform used in the present study had been used instead of karyotyping in the 276 pregnancies with abnormal cardiac ultrasound findings, all the clearly clinically significant chromosomal abnormalities diagnosed by karyotyping (which excludes inherited balanced rearrangements) except the three triploidies may have been detected. Moreover, 22q11.2 deletion syndrome cases and the additional chromosomal abnormality detected on CMA would have been diagnosed. Although we are aware that further studies are needed in this field, we believe that these data are encouraging and suggest that CMA might be an attractive alternative to karyotyping in the prenatal diagnosis of fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings. We also think that a rapid and inexpensive method for the detection of triploidy and common aneuploidies (such as quantitative fluorescent polymerase chain reaction) should be performed prior to CMA⁴⁵. In such a scenario, triploidies would not be missed and using CMA for the detection of common aneuploidies would be avoided. The problem of overlooking triploidies could also be overcome using a microarray platform interrogating SNPs^{10,22}.

The case with the translocation t(5;8) and two imbalances around 8q breakpoint highlights once more the importance of performing microarray analysis in pregnancies with ultrasound abnormalities and an apparently balanced *de novo* chromosomal rearrangement¹². Among genes located within the deleted regions, we believe the strongest candidate to explain the complex fetal CHD is *CHD7*. Mutations or deletions in this gene cause CHARGE syndrome, which is an autosomal dominant multiple-malformation syndrome for which CHDs are one of the cardinal clinical features⁴⁶.

In conclusion, our results show the potential of CMA for the detection of chromosomal imbalances in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings. Although further studies are needed in this area, with larger cohorts analyzed, CMA emerges as an appealing alternative to conventional karyotyping in this group of pregnancies. In our opinion, diagnosis of the most common aneuploidies or triploidy should be excluded by a rapid and inexpensive method of genetic testing prior to CMA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the technical assistance of the laboratory staff. We would also like to thank Prof. Vermeesch and his team from KU Leuven (Belgium) for their support. This work was partially supported by grants PI07/0385 (IP: A. Sánchez) and PI11/01841 (IP: A. Sánchez), from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and jointly financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa (FEDER). The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL; American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young; endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2007; **115**: 3015–3038.
- Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Clusellas N, Margarit E, Martínez-Barrios E, Martínez JM, Sánchez A. MLPA: a prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects? *Gene* 2012; **500**: 151–154.
- ACOG Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2009; **114**: 1161–1163.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. 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.

5. Brady PD, Devriendt K, Deprest J, Vermeesch JR. Array-based approaches in prenatal diagnosis. *Methods Mol Biol* 2012; **838**: 151–171.
6. Shaffer LG, Dabell MP, Rosenfeld JA, Neill NJ, Ballif BC, Coppinger J, Diwan NR, Chong K, Shohat M, Chitayat D. Referral patterns for microarray testing in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2012; **32**: 611.
7. Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalprà L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, Pecile V, Simoni G, Zuffardi O, Giardino D. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; **39**: 384–388.
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; **33**: 923–929.
9. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, Kilby MD. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; **37**: 6–14.
10. Srebniak MI, Boter M, Oudesluijs GO, Cohen-Overbeek T, Govaerts LC, Diderich KE, Oegema R, Knapen MF, van de Laar IM, Joosten M, Van Opstal D, Galjaard RJ. Genomic SNP array as a gold standard for prenatal diagnosis of foetal ultrasound abnormalities. *Mol Cytogenet* 2012; **5**: 14.
11. Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragónés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Mori MA, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet* 2012; **131**: 513–523.
12. Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG* 2012; **119**: 614–625.
13. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 2007; **28**: 2778–2784.
14. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, Jacobsen JR, Schubert M, Jurkatis J, Tzschach A, Ropers HH, Ullmann R. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet* 2008; **45**: 704–709.
15. Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang SH, Lalani S, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 2008; **122**: 1310–1318.
16. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, Zinn AR, Garg V. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res* 2008; **64**: 358–363.
17. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, Gorham JM, Gabriel S, Altshuler DM, Quintanilla-Dieck Mde L, Artunduaga MA, Eavey RD, Plenge RM, Shadick NA, Weinblatt ME, De Jager PL, Hafler DA, Breitbart RE, Seidman JG, Seidman CE. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 2009; **41**: 931–935.
18. Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, de Ravel T, Singer A, Rayyan M, Allegaert K, Vanhole C, Eyskens B, Vermeesch JR, Gewillig M, Devriendt K. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J Pediatr* 2010; **156**: 810–817.
19. Schmid M, Stary S, Blaicher W, Gollinger M, Husslein P, Streubel B. Prenatal genetic diagnosis using microarray analysis in fetuses with congenital heart defects. *Prenat Diagn* 2012; **32**: 376–382.
20. Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, Rorem E, Cowan J, Craigo SD, Tighiouart H, Wilkins-Haug LE. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* 2009; **29**: 1213–1217.
21. Tyreman M, Abbott KM, Willatt LR, Nash R, Lees C, Whittaker J, Simonis I. High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *J Med Genet* 2009; **46**: 531–541.
22. Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits AP, de Leeuw N. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250 k SNP array analysis. *J Med Genet* 2010; **47**: 586–594.
23. Faas BH, Feenstra I, Eggink AJ, Kooper AJ, Pfundt R, van Vugt JM, de Leeuw N. Non-targeted whole genome 250 K SNP array analysis as replacement for karyotyping in fetuses with structural ultrasound anomalies: evaluation of a one-year experience. *Prenat Diagn* 2012; **32**: 362–370.
24. Mademont-Soler I, Morales C, Armengol L, Soler A, Sánchez A. Description of the smallest critical region for Dandy–Walker malformation in chromosome 13 in a girl with a cryptic deletion related to t(6;13)(q23;q32). *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 2308–2312.
25. Gembruch U, Baschat AA, Knöpfle G, Hansmann M. Results of chromosomal analysis in fetuses with cardiac anomalies as diagnosed by first- and early second-trimester echocardiography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; **10**: 391–396.
26. Chaoui R, Körner H, Bommer C, Göldner B, Bierlich A, Bollmann R. Prenatal diagnosis of heart defects and associated chromosomal aberrations. *Ultraschall Med* 1999; **20**: 177–184.
27. Manji S, Roberson JR, Wiktor A, Vats S, Rush P, Diment S, Van Dyke DL. Prenatal diagnosis of 22q11.2 deletion when ultrasound examination reveals a heart defect. *Genet Med* 2001; **3**: 65–66.
28. Comas Gabriel C, Galindo A, Martínez JM, Carrera JM, Gutiérrez-Larraya F, de la Fuente P, Puerto B, Borrell A. Early prenatal diagnosis of major cardiac anomalies in a high-risk population. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 586–593.
29. Paladini D, Russo M, Teodoro A, Pacileo G, Capozzi G, Martinelli P, Nappi C, Calabrò R. Prenatal diagnosis of congenital heart disease in the Naples area during the years 1994–1999 – the experience of a joint fetal–pediatric cardiology unit. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 545–552.
30. Bellucco FT, Belangero SI, Farah LM, Machado MV, Cruz AP, Lopes LM, Lopes MA, Zugaib M, Cernach MC, Melaragno MI. Investigating 22q11.2 deletion and other chromosomal aberrations in fetuses with heart defects detected by prenatal echocardiography. *Pediatr Cardiol* 2010; **31**: 1146–1150.
31. Bretelle F, Beyer L, Pellissier MC, Missirian C, Sigaudy S, Gannerre M, D’Ercole C, Philip N. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet* 2010; **53**: 367–370.
32. Rosenfeld JA, Amrom D, Andermann E, Andermann F, Veilleux M, Curry C, Fisher J, Deputy S, Aylsworth AS, Powell CM, Manickam K, Heese B, Maisenbacher M, Stevens C, Ellison JW, Upton S, Moeschler J, Torres-Martinez W, Stevens A, Marion R, Pereira EM, Babcock M, Morrow B, Sahoo T, Lamb AN, Ballif BC, Paciorkowski AR, Shaffer LG. Genotype–phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics* 2012; **13**: 31–47.
33. Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA, Theisen A, Ballif BC, Bejjani BA. Comparison of microarray-based

- detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* 2008; 28: 789–795.
34. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn* 2009; 29: 1156–1166.
 35. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005; 42: 121–128.
 36. 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: 719–727.
 37. 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: 29–39.
 38. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, Quarello E, Escalona A, Le Sciellour C, Serazin V, Roume J, Ville Y, de Mazancourt P, Selva J. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther* 2009; 25: 277–284.
 39. 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: 1131–1137.
 40. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, Georgiou I, Velissariou V, Patsalis PC. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet* 2010; 3: 24.
 41. Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, Thiebaugeorges O, Miton A, Beri M, Bonnet C, Nemos C, Foliguet B, Jonveaux P. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn* 2010; 30: 333–341.
 42. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, Cheon CK, Hwang SH, Kang HY. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol Cytogenet* 2011; 4: 12.
 43. D'Amours G, Kibar Z, Mathonnet G, Fetni R, Tihy F, Désilets V, Nizard S, Michaud J, Lemyre E. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. *Clin Genet* 2012; 81: 128–141.
 44. Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, Shaw C, Lupski JR, Beaudet A, Patel A, Cheung SW, Van den Veyver I. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with > 1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn* 2012; 32: 351–361.
 45. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 87–98.
 46. Janssen N, Bergman JE, Swertz MA, Tranebjaerg L, Lodahl M, Schoots J, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM, Hoefsloot LH. Mutation update on the *CHD7* gene involved in CHARGE syndrome. *Hum Mutat* 2012; 33: 1149–1160.

DISCUSSIÓ

Les alteracions cromosòmiques constitucionals representen una de les principals causes d'anomalies congènites a la població, i el seu diagnòstic durant l'etapa prenatal és el principal objectiu de la majoria de procediments invasius que es realitzen durant l'embaràs. Atès que els estudis citogenètics no es poden oferir de manera universal a totes les gestants pel seu elevat cost i el risc de pèrdua gestacional associat, únicament es realitzen en aquells casos en què es considera que existeix un risc d'anomalia cromosòmica incrementat (p.e. en presència d'anomalies ecogràfiques fetals).

Des de la dècada dels 70, el cariotip convencional és el *gold standard* del diagnòstic citogenètic prenatal. En els últims anys, però, els avanços tecnològics han permès el desenvolupament de tècniques de citogenètica molecular que ofereixen característiques molt atractives, la principal de les quals és l'elevada resolució. En diagnòstic postnatal, les situacions en què cal aplicar aquestes tècniques estan ben establertes [Miller *et al.*, 2010], però el paper que han de jugar durant l'etapa prenatal encara no està ben definit i actualment està sent estudiat en profunditat per la comunitat mèdica i científica [Bui *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012].

La present tesi ha estat realitzada amb l'objectiu d'avaluar la contribució del cariotip i les tècniques de citogenètica molecular FISH, MLPA i CMA en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques, amb especial interès per aquelles gestacions amb anomalies ecogràfiques.

1. La citogenètica convencional en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques

Les anomalies ecogràfiques constitueixen una de les principals indicacions de procediment invasiu de diagnòstic prenatal, però n'existeixen d'altres que també s'associen a riscos incrementats d'anomalia cromosòmica fetal. Tenint en compte que conèixer la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques per a cada indicació clínica és fonamental per a l'assessorament genètic de les gestants, la primera part d'aquesta tesi ha consistit en una revisió de les anomalies cromosòmiques diagnosticades al cariotip i les seves indicacions en les 29.883 mostres de líquid amniòtic rebudes entre els anys 1998 i 2009 a l'Hospital Clínic de Barcelona.

Els resultats d'aquesta sèrie, que és la més àmplia publicada al nostre país d'aquestes característiques, indiquen que el cariotip és una eina robusta i efectiva per al diagnòstic d'anomalies cromosòmiques durant l'etapa prenatal. En el 99,5% dels casos es va obtenir resultat dels estudis citogenètics, i la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques va ser del 2,9%, un valor molt similar al reportat en l'estudi més gran prèviament publicat (3,1%; 973/31.615) [Han *et al.*, 2008]. Les aneuploïdies autosòmiques clàssiques (trisomies 21, 18 i 13) van ser les anomalies cromosòmiques més freqüentment diagnosticades (48,1%), seguides de les reorganitzacions cromosòmiques estructurals (26,2%) i les aneuploïdies dels cromosomes sexuals (13,2%); una distribució també similar a la reportada en el treball de Han *et al.* (2008).

Aquests percentatges, però, corresponen a la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques per al conjunt d'indicacions de procediment invasiu vigents durant el període avaluat; que inclouen, principalment: cribratge prenatal positiu, anomalies ecogràfiques, translucidesa nucal incrementada, quists de plexes coroideus, anomalia cromosòmica prèvia, reorganització cromosòmica parental, edat materna avançada, i ansietat materna. La distribució d'aquestes indicacions ha variat al llarg dels anys, degut a que els criteris de selecció de gestants amb un risc incrementat d'anomalia cromosòmica fetal han evolucionat, sent cada vegada més estrictes i efectius. Si bé l'edat materna avançada fou inicialment la principal indicació d'amniocentesi; en els últims anys ho ha estat el cribratge prenatal positiu, que inclou l'edat materna i varis paràmetres bioquímics (i, en funció del moment del cribratge, també ecogràfics) que sovint es troben alterats en gestacions amb trisomia 21.

Centrant-nos en la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques per a cadascuna de les indicacions de procediment invasiu, la que s'associa a un valor predictiu positiu (VPP) més elevat és la presència d'una reorganització cromosòmica parental. Aquests resultats eren esperats i són consistents amb el fet que en aquests casos existeix una probabilitat elevada de que la descendència hereti l'anomalia, ja sigui en les seves formes equilibrada o desequilibrades. Excloent aquesta indicació, les que presenten taxes de detecció d'anomalies cromosòmiques més elevades són la translucidesa nucal incrementada (VPP 9,2%) i les anomalies

ecogràfiques (VPP 6,6%), indicant un cop més la importància de l'ecografia fetal per a la selecció de gestacions a risc d'alteracions cromosòmiques [Nicolaidis *et al.*, 1992; Karaoguz *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008].

En funció de l'anomalia cromosòmica diagnosticada, la distribució d'indicacions canvia de forma significativa. Mentre que el cribratge prenatal positiu i l'edat materna avançada són les indicacions més freqüents per al diagnòstic de les aneuploïdies autosòmiques clàssiques, les anomalies ecogràfiques destaquen com a principal indicació per a la detecció de fetus amb monosomia X, triploïdies, reorganitzacions cromosòmiques desequilibrades i trisomies rares. Que el cribratge prenatal positiu i l'edat materna avançada constitueixin les indicacions més freqüents per al diagnòstic de les aneuploïdies autosòmiques clàssiques és consistent amb el fet que els mètodes de cribratge prenatal han estat bàsicament dissenyats per a la detecció de trisomia 21, i quan aquests encara no havien estat desenvolupats, l'edat materna avançada era l'únic paràmetre demostrat associat a un risc incrementat de trisomia. D'altra banda, que les anomalies ecogràfiques siguin la indicació més comuna per a la detecció de monosomies X i triploïdies no és sorprenent, ja que aquestes alteracions cromosòmiques generalment s'associen a repercussions fenotípiques fetals severes. No obstant, que les anomalies ecogràfiques també hagin estat la indicació principal per a la detecció de reorganitzacions cromosòmiques desequilibrades i trisomies rares és especialment rellevant. Està

àmpliament descrit que la majoria de desequilibris cromosòmics comporten una repercussió fenotípica postnatal greu, que inclou retard mental i anomalies congènites, però les dades d'aquest estudi indiquen que aquestes reorganitzacions desequilibrades i trisomies rares també s'associarien a troballes ecogràfiques prenatales, indicant que aquests desequilibris afecten de forma precoç a l'individu.

Finalment, cal comentar la davallada del nombre d'estudis citogenètics en líquid amniòtic observada en els darrers anys, paral·lelament a l'increment de les sol·licituds de cariotip en vellositats corials. Aquests canvis són atribuïbles a la implantació progressiva des de l'any 2005 a Catalunya del cribratge prenatal de primer trimestre per a la detecció de fetus amb trisomia 21, que possibilita realitzar un procediment invasiu durant el primer trimestre de la gestació (biòpsia corial), amb les avantatges obstètriques i psicològiques que això comporta [Borrell *et al.*, 1996]. Tenint en compte que el cribratge prenatal de primer trimestre ofereix major efectivitat i una millor selecció de les gestants a risc d'anomalia cromosòmica que el de segon trimestre [Crossley *et al.*, 2002; Borrell *et al.*, 2004], l'increment de les sol·licituds de cariotip en vellositats corials no ha estat tan dràstic com la davallada dels estudis en líquid amniòtic i, alhora, la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques ha augmentat. També és important tenir present que la taxa de detecció d'anomalies en vellositat corial és en part superior degut a la precocitat del diagnòstic, possibilitant la detecció d'anomalies cromosòmiques que no

arribarien a segon trimestre de la gestació i que, per tant, no s'arribarien a diagnosticar en líquid amniòtic.

2. Desequilibris subtelomèrics críptics en fetus amb troballes ecogràfiques i cariotip normal

Els avenços tecnològics dels últims anys en el camp de la citogenètica molecular han portat a la descripció d'un gran nombre d'anomalies cromosòmiques críptiques. Dins d'aquesta categoria, les primeres en estudiar-se van ser les anomalies que involucraven les regions subtelomèriques dels cromosomes [De Vries *et al.*, 2003]. En el moment de realització d'aquest treball, varis estudis postnatsals havien posat de manifest que la incidència de desequilibris críptics de les regions subtelomèriques en pacients amb anomalies congènites era del 3-6% [Ravnan *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2008; Stegmann *et al.*, 2008], però es disposava de poques dades durant l'etapa prenatal. Tot i que varis grups havien investigat la freqüència d'aquests desequilibris en fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, reportant taxes de detecció del 0% al 5,4%, la majoria d'aquests estudis consistien en sèries de mida molt reduïda [Le Caignec *et al.*, 2005; Gignac *et al.*, 2006; Shaffer *et al.*, 2008; Kleeman *et al.*, 2009; Vialard *et al.*, 2009]. Amb l'objectiu de precisar la freqüència de desequilibris subtelomèrics críptics i determinar la utilitat del cribratge prenatal de les regions subtelomèriques, s'estudiaren mitjançant MLPA subtelomèrica 229 gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal.

L'MLPA revelà desequilibris subtelomèrics críptics en 3 de les 229 gestacions estudiades, concretament una deleció 14qter, una deleció 20pter, i una duplicació X/Ypter. Per tant, la taxa de detecció de desequilibris subtelomèrics críptics observada va ser del 1,3%, una incidència molt similar a la trobada en l'estudi previ més gran (1,8%; 2/110) [Shaffer *et al.*, 2008]. D'acord amb la literatura publicada i la informació disponible a les bases de dades *on line*, les delecions 14qter i 20pter són clínicament rellevants, mentre que la duplicació X/Ypter és de significat clínic incert. D'altra banda, únicament la deleció 14qter sembla correlacionar-se amb les anomalies ecogràfiques fetals observades, tal i com es discuteix a continuació.

Els pacients amb delecions 14qter presenten una sèrie d'anomalies fenotípiques recurrents, tot i que les malformacions congènites majors són poc freqüents. En alguns casos diagnosticats prenatalment s'han reportat anomalies ecogràfiques, que inclouen edema nucal o subcutani generalitzat, genitals ambigus, retard de creixement intrauterí i cos callós hipoplàsic [van Karnebeek *et al.*, 2002a; Schneider *et al.*, 2008]. En el present estudi, el fetus diagnosticat amb una deleció 14qter presentava edema generalitzat, mal posició de mans, ossos llargs curts i genitals ambigus. Per tant, tenint en compte que varies d'aquestes anomalies han estat prèviament descrites en associació amb delecions de la regió 14qter, en aquest cas sembla poder establir-se una correlació entre l'anomalia cromosòmica diagnosticada i les troballes ecogràfiques fetals.

Pel que fa a la deleció 20pter, els pacients amb desequilibris d'aquesta regió cromosòmica presenten retard del desenvolupament, dismòrfia facial, retard del creixement, hipotonia i hipoplàsia renal; però no s'ha reportat cap diagnòstic prenatal d'aquesta anomalia en associació amb troballes ecogràfiques [Ravnan *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007]. Donat que el fetus amb una deleció 20pter d'aquest treball presentava cardiopatia i higroma quíctic, i cap d'aquestes anomalies ha estat prèviament descrita en associació amb aquest desequilibri, no es pot establir de forma clara una correlació genotip-fenotip en aquest cas.

Finalment, en relació a la duplicació X/Ypter detectada, aquesta no sembla ser la responsable del retard de creixement intrauterí sever diagnosticat en el fetus. La gestant presentava preeclàmpsia i la mida de la placenta es trobava per sota del percentil 3, i ambdues anomalies podrien explicar el fenotip fetal observat. A més, les duplicacions X/Ypter no acostumen a associar-se a malformacions majors ni a troballes ecogràfiques prenatales [Chagnon *et al.*, 2006; Visootsak *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2008].

La baixa taxa de detecció de desequilibris subtelomèrics crítics clínicament rellevants en gestacions amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal, i la pobra correlació genotip-fenotip observada indiquen que les troballes ecogràfiques en general no semblen ser bones predictores de desequilibris subtelomèrics crítics clínicament rellevants. En conseqüència, el cribratge de les regions subtelomèriques en fetus amb

anomalies ecogràfiques i cariotip normal no representa una eina crucial per al diagnòstic prenatal d'aquestes gestacions.

3. Estudi de gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques

Les malformacions cardíaques representen una de les anomalies ecogràfiques més freqüents durant l'etapa prenatal, i la seva principal causa coneguda són les anomalies cromosòmiques microscòpiques, seguides per la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2. No obstant, s'han descrit més de 750 síndromes que inclouen la cardiopatia entre els seus signes cardinals. Això comporta que en un fetus amb cardiopatia, cariotip normal, estudi de FISH de la regió 22q11.2 negatiu, i sense història familiar positiva o antecedents rellevants durant la gestació, determinar l'etiologia de la malformació cardíaca pugui resultar impossible [Pajkrt *et al.*, 2004; Wimalasundera and Gardiner, 2004; Bellucco *et al.*, 2010; Bretelle *et al.*, 2010]. En aquests casos, l'assessorament genètic és particularment complex, ja que sovint no és possible distingir entre cardiopaties aïllades i sindròmiques prenatalment.

Tenint en compte l'elevada incidència de les cardiopaties durant l'etapa prenatal i la importància de les anomalies cromosòmiques en la seva etiologia, l'última part d'aquesta tesi està centrada en el seu estudi, i en l'avaluació de diferents aproximacions diagnòstiques en l'àmbit de la citogenètica.

3.1. Anàlisi comparatiu de l'MLPA de cardiopaties i la FISH de la regió 22q11.2 per a l'estudi de gestacions amb anomalies ecogràfiques cardíques

Generalment, quan es sospita prenatalment o postnatalment una Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 s'acostuma a realitzar un estudi de FISH amb sondes *locus* específiques d'aquesta regió cromosòmica. Amb l'objectiu de valorar la possibilitat de reemplaçar la FISH per estudis d'MLPA per al diagnòstic prenatal de malformacions cardíques, s'ha realitzat un anàlisi comparatiu d'ambdues tècniques. Concretament, s'han avaluat els *kits* d'MLPA comercials específics de cardiopaties P023 i P250 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), que permeten el diagnòstic de desequilibris cromosòmics a la regió 22q11.2 i també a altres regions del genoma associades a cardiopaties congènites.

En primer lloc, mitjançant l'estudi per MLPA de quatre gestacions amb delecions de la regió 22q11.2 conegudes (prèviament diagnosticades per FISH), s'ha demostrat que l'MLPA específica de cardiopaties és una tècnica fiable per al diagnòstic de desequilibris a 22q11.2, un resultat que és consistent amb els estudis prèviament realitzats per altres grups [Fernández *et al.*, 2005; Vorstman *et al.*, 2006; Stachon *et al.*, 2007; Jalali *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009]. A més, els *kits* utilitzats també van permetre caracteritzar de forma precisa totes les microdelecions. Els quatre fetus presentaven la deleció típica de 3Mb en hemizigosi, un resultat que és compatible amb la literatura publicada, ja que el 90% dels pacients amb Sd.

de la deleció cromosòmica 22q11.2 presenten una microdeleció d'aquesta mida [Edelmann *et al.*, 1999]. No obstant, és important tenir present que no hi ha una correlació estricta entre la mida de la microdeleció i la severitat de les anomalies fenotípiques per a aquesta síndrome microdeleccional, de manera que caracteritzar de forma precisa el desequilibri no esdevé fonamental per a l'establiment del pronòstic d'una gestació [Stachon *et al.*, 2007].

En segon lloc, s'utilitzaren els *kits* d'MLPA P023 i P250 per a estudiar 55 fetus amb cardiopatia, cariotip normal i resultats de FISH de la regió 22q11.2 negatius. En 50 casos es va poder obtenir resultat dels estudis d'MLPA, i en cap d'ells es detectà un desequilibri en les regions analitzades. Aquests resultats semblen indicar que desequilibris crítics de les regions incloses en els *kits* (amb l'excepció de les microdeleccions a 22q11.2) són infreqüents en gestacions amb malformacions cardíques fetals.

Amb la finalitat de comparar la FISH i l'MLPA per a l'estudi de gestacions amb cardiopatia, s'han avaluat les següents variables per a cadascuna d'aquestes tècniques: potencial diagnòstic, temps d'obtenció de resultats, taxa de repetició, taxa de no obtenció de resultats, i cost. Si bé és cert que els *kits* d'MLPA utilitzats permetrien diagnosticar un espectre més ampli d'anomalies cromosòmiques que la FISH convencional (l'MLPA permet el diagnòstic de microdeleccions i microduplicacions a 22q11.2 i a altres regions genòmiques, mentre que la FISH bàsicament permet

detectar les microdelecions a 22q11.2 més comunes), els nostres resultats indiquen que desequilibris diferents de la microdeleció 22q11.2 típica són infreqüents en fetus amb cardiopatia. Concretament, a la sèrie aquí presentada, l'ús de l'MLPA enlloc de la FISH no hagués incrementat el nombre de diagnòstics. D'altra banda, els estudis de FISH en líquid amniòtic acostumen a realitzar-se en amniòcits no cultivats, mentre que l'MLPA normalment requereix cultiu cel·lular per a l'obtenció de DNA de bona qualitat i en suficient quantitat [Van Opstal *et al.*, 2009; Armengol *et al.*, 2011]. Aquesta diferència comporta que els resultats dels estudis de FISH es puguin obtenir generalment en un període breu de temps (5 dies), fet que és crucial en diagnòstic prenatal; mentre que per a l'MLPA la mitjana és de 28 dies. Pel que fa a les taxes de repetició i de no obtenció de resultats, aquestes són significativament superiors per a l'MLPA que per a la FISH (16,9% i 8,5%; i 5,1% i 0%, respectivament). Finalment, el cost d'ambdues tècniques és similar. Totes aquestes dades suggereixen que la FISH amb sondes *locus* específiques de la regió 22q11.2 hauria de seguir sent la tècnica d'elecció per al diagnòstic de fetus amb malformacions cardíaques enfront l'MLPA.

3.2. Anomalies cromosòmiques microscòpiques i críptiques en fetus amb troballes ecogràfiques cardíaques

En primer lloc, amb l'objectiu de determinar la freqüència d'anomalies cromosòmiques microscòpiques i microdelecions de la regió 22q11.2 en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques a la nostra població,

s'ha realitzat un anàlisi retrospectiu dels resultats obtinguts dels estudis citogenètics convencionals i de FISH de la regió 22q11.2 en les 276 gestacions referides per anomalies cardíques i/o marcadors ecogràfics cardíacs a l'Hospital Clínic de Barcelona entre els anys 2009 i 2011.

La incidència observada d'anomalies cromosòmiques microscòpiques en aquest grup de gestacions ha estat del 15,9% (44/276); i si s'exclouen els marcadors ecogràfics i únicament es consideren les malformacions cardíques, aquesta incidència se situa al 17,6% (36/205), un valor comparable a l'obtingut en estudis prèviament publicats [Gembruch *et al.*, 1997; Chaoui *et al.*, 1999; Manji *et al.*, 2001; Comas *et al.*, 2002; Paladini *et al.*, 2002; Bellucco *et al.*, 2010]. Les anomalies cromosòmiques més freqüentment diagnosticades han estat les aneuploïdies autosòmiques clàssiques (59,1%), seguides per les reorganitzacions cromosòmiques estructurals (29,6%). Els resultats obtinguts també indiquen que la freqüència d'anomalies cromosòmiques microscòpiques varia significativament en funció de si s'observen o no anomalies extracardíques (30,1% *versus* 6,1%), i del tipus de troballa ecogràfica cardíaca diagnosticada. Mentre que les anomalies de cor esquerre són les que presenten un valor predictiu positiu més elevat (29,6%), les anomalies de cor dret no semblen associar-se amb anomalies cromosòmiques microscòpiques (VPP 0%).

D'altra banda, la freqüència de la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 en aquelles gestacions amb cardiopatia, cariotip

normal, i en què s'havia sol·licitat estudi de FISH de la regió 22q11.2 ha estat del 6,4% (5/78), un valor consistent amb la literatura prèvia (5,4%) [Bretelle *et al.*, 2010]. Per tant, els resultats obtinguts corroboren un cop més la forta associació entre anomalies cromosòmiques i troballes ecogràfiques cardíques.

En el moment de realització d'aquest treball es disposava de pocs estudis que haguessin avaluat la incidència de desequilibris cromosòmics críptics diferents de la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques. Donat que la informació en aquest camp era limitada, i que estudis postnatsals havien revelat que el 10-25% dels pacients amb cardiopatia presentaven desequilibris cromosòmics submicroscòpics [Thienpont *et al.*, 2007; Erdogan *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008; Greenway *et al.*, 2009; Breckpot *et al.*, 2010]; la segona part d'aquest projecte va consistir en determinar la seva freqüència en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques i cariotip normal, i també definir la utilitat de les tècniques de CMA en aquestes gestacions.

Dels 276 fetus amb troballes ecogràfiques cardíques referits durant el període 2009-2011, se n'estudiaren 51 mitjançant una plataforma comercial d'array CGH dirigida amb *backbone* a una resolució d'1Mb. Els criteris de selecció d'aquests fetus van ser, a part de les troballes ecogràfiques cardíques, la presència d'un cariotip normal i resultat negatiu (o sense estudi) de la Sd. de la deleció cromosòmica 22q11.2. En

aquest grup de gestacions, es diagnosticà 1 desequilibri cromosòmic clínicament rellevant, i no es detectà cap variant de significat clínic incert. Per tant, aquests resultats indiquen que si s'utilitzés una plataforma de microarray d'aquestes característiques com a eina complementària al cariotip en gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques, s'incrementaria la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants un 2%.

L'anomalia cromosòmica diagnosticada consistia en una deleció de la regió 6q21q22.31 de 14,9Mb *de novo* en un fetus amb tetralogia de Fallot, retard de creixement intrauterí sever i anomalies bilaterals de les extremitats superiors. El desequilibri es considera responsable del fenotip fetal observat, ja que les anomalies ecogràfiques diagnosticades en aquest fetus havien estat prèviament descrites en pacients amb delecions de 6q solapants [Rosenfeld *et al.*, 2012]. És important destacar que aquesta anomalia no és crítica, però havia passat desapercibuda al cariotip degut a la mala qualitat de les metafases obtingudes. Situacions similars han estat prèviament reportades per Valduga *et al.* (2010), Fiorentino *et al.* (2011) i D'Amours *et al.* (2012).

En el moment de la publicació dels resultats d'aquest treball, la seva comparació amb els d'altres estudis resultava difícil. Malgrat que la majoria de sèries prenatales en què s'havien utilitzat plataformes de CMA incloïen fetus amb anomalies ecogràfiques cardíaques, en la majoria d'elles el nombre de fetus amb cardiopatia era reduït i no es reportava

específicament la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques per a aquesta anomalia ecogràfica en concret [Shaffer *et al.*, 2008; Coppinger *et al.*, 2009; Kleeman *et al.*, 2009; Tyreman *et al.*, 2009; Faas *et al.*, 2010; Faas *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012]. Les úniques excepcions d'aquests primers estudis són els treballs de Schmid *et al.* (2012) i Lee *et al.* (2012). Schmid *et al.* van realitzar array CGH en 12 fetus amb cardiopatia, cariotip normal i estudis de FISH de la regió 22q11.2 negatius, i van detectar 3 desequilibris cromosòmics potencialment causals (25%): una deleció de 15qter de 9Mb, una duplicació de 17p de 3,5Mb, i una trisomia 7 en mosaic. Aquests resultats són significativament diferents dels nostres, probablement degut a diferències en la mida de la cohort i en els criteris de selecció (més restrictius en l'estudi de Schmid *et al.*). D'altra banda, Lee *et al.* estudiaren 3.171 gestacions mitjançant CMA, de les quals 50 presentaven cardiopatia, i en 7 d'elles (14%) es diagnosticaren delecions o duplicacions cromosòmiques segmentàries. No obstant, el seu estudi està centrat en determinar la utilitat clínica de l'array CGH en diagnòstic prenatal en general, i no s'especifica quants d'aquests desequilibris eren microscòpics i quants críptics.

El panorama ha canviat radicalment amb l'estudi recentment publicat per Shaffer *et al.* (2012b), en el qual s'avaluen els resultats obtinguts mitjançant CMA en 2.858 gestacions amb anomalies ecogràfiques, i es reporta la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants per a les anomalies ecogràfiques més freqüents. Dels 580 fetus

amb anomalies del sistema cardiovascular que inclou l'estudi, 46 (7,9%) presentaven CNVs patogèniques. Aquesta incidència és superior a l'obtinguda en la sèrie presentada en la present tesi (2%), i aquestes diferències probablement són degudes a: i) en l'estudi de Shaffer *et al.* el 72% dels casos presentaven cariotip normal, però en el 28% restant no es disposava del resultat del cariotip en el moment de realització de la CMA, i algunes anomalies probablement haguessin pogut ser diagnosticades per citogenètica convencional; ii) les diferències en la mida de la cohort analitzada en cada estudi; iii) els criteris de selecció (més restrictius en el treball de Shaffer *et al.*); iv) la proporció de casos amb anomalies extracardíaques (45,1% en aquest treball *versus* 59,1% en l'estudi de Shaffer *et al.*); i v) la plataforma de CMA utilitzada en cadascun dels estudis (dirigida amb *backbone* en aquest treball, i principalment *whole-genome* en el de Shaffer *et al.*).

En el treball de Shaffer *et al.* (2012b) també s'especifica la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques críptiques mitjançant CMA per a diferents anomalies ecogràfiques cardíques: cor esquerre hipoplàsic 13,2%; tetralogia de Fallot 11,6%; defectes septals ventriculars 6,1%; i dextrocàrdia/*situs inversus* 2,1%. Per tant, de les anomalies cardíques que avaluen, la que presenta un valor predictiu positiu més elevat per a la detecció de desequilibris submicroscòpics és el cor esquerre hipoplàsic. És important destacar que els resultats d'aquesta tesi han revelat que les malformacions cardíques que presenten un VPP més elevat per a la

detecció d'anomalies cromosòmiques microscòpiques són les anomalies de cor esquerre (29,6%; 8/27). Atès que aquesta categoria inclou diferents malformacions cardíques (principalment fetus amb cor esquerre hipoplàsic, però també algun cas amb coartació d'aorta i estenosi aòrtica), s'ha calculat independentment el VPP del cor esquerre hipoplàsic per a la detecció d'anomalies cromosòmiques microscòpiques a la nostra sèrie, i s'ha obtingut un valor del 26,3% (5/19; dada no presentada anteriorment). Per tant, les dades actualment disponibles indiquen que existeix una forta associació entre el cor esquerre hipoplàsic i les alteracions cromosòmiques, tant microscòpiques com críptiques.

D'acord amb els resultats obtinguts, si en les 276 gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques de la sèrie presentada s'hagués utilitzat un array CGH dirigit amb *backbone* a una resolució de 1Mb i no s'hagués realitzat cariotip, totes les anomalies cromosòmiques clínicament rellevants diagnosticades per citogenètica convencional, excepte 3 triploïdies, s'haurien pogut detectar. Amb la finalitat de diagnosticar les triploïdies, i també d'evitar utilitzar plataformes de CMA per al diagnòstic de les aneuploïdies clàssiques, seria recomanable realitzar una QF-PCR prèviament als estudis de microarray. Utilitzant l'estratègia QF-PCR + CMA en la sèrie aquí presentada, totes les anomalies clínicament rellevants diagnosticades al cariotip també s'haguessin detectat. A més, també s'haguessin diagnosticat les microdeleccions a 22q11.2, i s'hagués incrementat un 2% la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques

clínicament rellevants. Aquests resultats són encoratjadors i suggereixen que la CMA podria ser una alternativa molt atractiva al cariotip convencional en el diagnòstic prenatal de les cardiopaties fetals. No obstant, els estudis realitzats en aquest camp encara són insuficients i es necessiten treballs amb cohorts més àmplies per tal de determinar la idoneïtat de reemplaçar el cariotip convencional per estudis de CMA en aquestes gestacions.

Quan s'inicià aquest estudi, la utilització d'una plataforma d'array CGH dirigida amb *backbone* semblava la millor opció de CMA en diagnòstic prenatal, principalment per tal de minimitzar la detecció de variants de significat clínic incert. No obstant, estudis recents han demostrat que les plataformes *whole-genome* ofereixen taxes de detecció d'anomalies clínicament rellevants superiors a les *targeted* en diagnòstic prenatal, sense un increment significatiu de la proporció de VOUS [Coppinger *et al.*, 2009]. En conseqüència, i d'acord amb les recomanacions de varis grups amb àmplia experiència en aquest camp [Vetro *et al.*, 2012; Vermeesch *et al.*, 2012], si el present estudi hagués estat dissenyat a dia d'avui, s'hauria utilitzat una plataforma *whole-genome*. En aquesta situació, la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants probablement hauria estat superior al 2% observat.

4. Caracterització d'anomalies cromosòmiques mitjançant tècniques de citogenètica molecular

La utilitat de les tècniques de citogenètica molecular per a la caracterització de reorganitzacions cromosòmiques i cromosomes

marcadors està àmpliament descrita [Feenstra *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a]; i en l'actualitat es recomana el seu ús com a complement al cariotip quan es diagnostica prenatalment una anomalia estructural de difícil caracterització per citogenètica convencional, o quan es detecta una reorganització cromosòmica o un cromosoma marcador supernumerari *de novo* [ACOG, 2009; Zuffardi *et al.*, 2011; Novelli *et al.*, 2012]. Seguint aquestes recomanacions, en aquesta tesi s'han aplicat les tècniques FISH, MLPA i CMA per a l'estudi de 6 gestacions amb alteracions cromosòmiques que complien aquests requisits.

En primer lloc, s'ha utilitzat la tècnica MLPA subtelomèrica per a la correcta caracterització de 5 reorganitzacions cromosòmiques desequilibrades diagnosticades prenatalment per citogenètica convencional. En tots els casos, l'MLPA va permetre la descripció precisa de l'alteració cromosòmica en un període relativament breu de temps, indicant la utilitat d'aquesta tècnica quan s'utilitza com complement als estudis citogenètics convencionals en aquestes gestacions.

D'aquests 5 casos, farem una menció especial a una translocació familiar entre els cromosomes Y i 12, ja que les translocacions Y;autosoma representen una anomalia cromosòmica poc comuna [Pinho *et al.*, 2005]. El cas índex d'aquesta família va ser un fetus amb cor esquerre hipoplàsic i isomerisme pulmonar dret; l'estudi citogenètic del qual (en líquid amniòtic) va revelar un cariotip anòmal, amb una banda extra a l'extrem terminal del braç llarg del cromosoma 12. Estudis d'MLPA subtelomèrica van posar de

manifest una monosomia 12q terminal i trisomia de la regió pseudoautosòmica 2, localitzada a X/Yqter. Al realitzar el cariotip als progenitors es va observar que el pare presentava el mateix cromosoma 12, i aparentment cap altra anomalia. Estudis de FISH van revelar que es tractava d'una translocació Y;12, equilibrada en el pare, però que el fetus havia heretat en un dels seus possibles estats desequilibrats. Per tant, es tractava d'una reorganització cromosòmica semicríptica, en la qual únicament un dels cromosomes derivatius era citogenèticament diagnosticable. Degut a l'elevat risc de recurrència, en la següent gestació de la parella es va realitzar el cariotip en vellositats corials. En aquest segon fetus, que no presentava anomalies ecogràfiques en primer trimestre, s'observà un cariotip masculí aparentment normal. No obstant, donat que el cromosoma Y del fetus havia de ser obligatòriament el derivatiu de l'Y patern, aquest fetus presentava l'estat desequilibrat alternatiu al primer fetus, tal i com van confirmar estudis d'MLPA. És important remarcar que el cariotip d'aquest segon fetus era aparentment normal i, per tant, el seu diagnòstic únicament va ser possible gràcies al diagnòstic del primer fetus, que va posar de manifest una reorganització cromosòmica familiar. Tenint en compte que la pèrdua o guany de la banda Yq12 no s'associa a anomalies congènites [Kühl *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007], el fenotip i la prognosi d'ambdós fetus seria conseqüència del desequilibri de 12qter. Estudis de FISH van permetre determinar que la regió 12qter en desequilibri incloïa 1,3Mb de la banda cromosòmica

12q24.33. D'acord amb la literatura publicada, en ambdós casos s'esperaria repercussió fenotípica postnatal, que inclouria retard mental, probablement com a conseqüència de les alteracions de dosi del gen *P2RX2* [Tajara *et al.*, 1985; Masuno *et al.*, 1987; Speleman *et al.*, 1993; van Karnebeek *et al.*, 2002b; Ireland *et al.*, 2004; Tozaki-Saitoh *et al.*, 2006; Niyazov *et al.*, 2007; OMIM; UCSC Genome Browser]. La cardiopatia del primer fetus és difícil de lligar amb la monosomia 12qter, ja que els casos publicats amb delecions 12qter no presenten aquesta malformació, i no s'han descrit gens candidats per a patologia cardíaca en aquesta regió cromosòmica. Per tant, la correlació genotip-fenotip en aquest cas no és clara; però és important destacar que, una vegada més, l'anomalia cromosòmica es detectà després del diagnòstic d'un fetus amb cor esquerre hipoplàsic. Tenint en compte el mal pronòstic de les anomalies cromosòmiques diagnosticades, la parella optà per una interrupció legal de l'embaràs en ambdues gestacions. Aquesta família és un exemple clar de que anomalies cromosòmiques de mal pronòstic poden passar inadvertides prenatalment, especialment en absència d'anomalies ecogràfiques.

D'altra banda, s'estudià mitjançant CMA un fetus amb cardiopatia i una reorganització cromosòmica aparentment equilibrada *de novo*. L'examen ecogràfic d'aquest fetus revelà una cardiopatia complexa (defecte septal atrioventricular amb cor esquerre hipoplàsic i agenèsia de la vàlvula pulmonar) i un quist de Blake; i el cariotip va posar de manifest una translocació recíproca aparentment equilibrada *de novo* entre els braços

llargs dels cromosomes 5 i 8. La CMA va revelar dues delecions intersticials a 8q, indicant que la translocació no era realment equilibrada; i estudis de FISH parentals van mostrar que ambdues delecions eren *de novo* en el fetus. Examinant els gens de les regions de 8q delecionades, el candidat més probable per explicar la cardiopatia complexa del fetus és *CHD7*. Mutacions o delecions d'aquest gen s'associen a la Síndrome de CHARGE, d'herència autosòmica dominant i que es caracteritza per la presència de múltiples malformacions, entre elles cardíaques [Janssen *et al.*, 2012; OMIM; UCSC Genome Browser]. Aquest cas confirma un cop més la importància de realitzar estudis de microarray en aquelles gestacions amb reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades *de novo*; i destaca altra vegada el paper del cor esquerre hipoplàsic en el diagnòstic de desequilibris cromosòmics.

5. Valoració de la necessitat de canviar els protocols de diagnòstic citogenètic prenatal actuals

A Catalunya, i també a nivell internacional, en l'actualitat el *gold standard* del diagnòstic citogenètic prenatal és el cariotip convencional [Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals, 2008; ACOG, 2009; Novelli *et al.*, 2012]. No obstant, per a la indicació d'anomalies ecogràfiques fetals, els resultats obtinguts en aquesta tesi i els d'altres estudis indiquen que la utilització de plataformes de microarray en aquelles gestacions amb cariotip normal permetria incrementar la taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques de forma significativa (un 2% i un

1,8-10,4% segons els resultats del present estudi i de les sèries més extenses publicades, respectivament) [Tyreman *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010; Armengol *et al.*, 2012; Faas *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012b; Wapner *et al.*, 2012]. Per tant, la CMA hauria de jugar un paper fonamental en el diagnòstic prenatal d'aquest grup de gestacions, i seria convenient aplicar-la a tots aquells fetus amb anomalies ecogràfiques i cariotip normal. Aquesta estratègia és consistent amb les guies clíniques d'actuació que han redactat col·lectius mèdics i científics de diferents països, com l'American College of Obstetricians and Gynecologists, el Canadian College of Medical Geneticists, i l'Italian Society of Human Genetics [ACOG, 2009; Duncan *et al.*, 2011; Novelli *et al.*, 2012]. És important remarcar, però, que cap d'aquestes recomanacions representa un consens internacional.

Per a les indicacions clíniques de diagnòstic prenatal que presenten un risc baix d'anomalia cromosòmica estructural (p.e. edat materna avançada o ansietat materna), en el context actual sembla que el cariotip segueix sent l'opció més apropiada [Zuffardi *et al.*, 2011]. La CMA presenta un potencial diagnòstic lleugerament superior al cariotip en aquestes gestacions (0,2-2,2% addicional) [Maya *et al.*, 2010; Strassberg *et al.*, 2011; Lee *et al.* 2012; Wapner, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a], però la taxa de detecció de VOUS descrita en alguns estudis encara és massa elevada com per considerar-la acceptable (1,7-4,2% d'acord amb els treballs de Shaffer *et al.*, 2012a; Wapner *et al.*, 2012; Armengol *et al.*, 2012; i Breman

et al., 2012) (aquest percentatge no inclou els estudis de Fiorentino *et al.*, 2011 i Lee *et al.*, 2012, en què no s'inclouen a la taxa de VOUS aquelles variants de significat clínic incert heretades). No obstant, és possible que el panorama canviï en els pròxims anys, ja que la utilització de les tècniques de CMA en diagnòstic prenatal és un camp en el qual s'està investigant intensament.

Els resultats d'aquesta tesi i els d'altres estudis també mostren l'eficàcia i la necessitat d'aplicar tècniques de citogenètica molecular (com la FISH, l'MLPA i/o la CMA) per a la caracterització de determinades anomalies cromosòmiques diagnosticades prenatalment, com per exemple reorganitzacions cromosòmiques estructurals aparentment equilibrades *de novo* i cromosomes marcadors supernumeraris *de novo* [Vialard *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010; Faas *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a]. Pel que fa a les primeres, la CMA permet determinar de forma ràpida i eficaç la presència de desequilibris críptics en els punts de trencament; i aquesta informació és fonamental per a l'assessorament genètic de les parelles, ja que el pronòstic d'una gestació variarà significativament en funció de si existeix o no guany i/o pèrdua de material genètic. Mentre que la presència d'un desequilibri cromosòmic comportarà un increment notable del risc d'anomalies congènites, la seva absència permetrà reduir-lo. No obstant, el risc d'alteracions fenotípiques associades a l'alteració cromosòmica mai es podrà descartar completament, ja que també cal tenir present que es pot interrompre un gen sensible a dosi en

els punts de trencament, o es pot produir efecte de posició o disomia uniparental. És important destacar que, en aquelles gestacions amb reorganitzacions cromosòmiques aparentment equilibrades *de novo*, la CMA s'ha d'oferir independentment de la presència o absència d'anomalies ecogràfiques fetals. Malgrat que moltes alteracions cromosòmiques s'associen a anomalies fetals detectables mitjançant ecografia, algunes anomalies cromosòmiques críptiques clínicament rellevants poden no associar-se a manifestacions prenatales, tal i com s'ha demostrat en aquesta tesi (família amb la translocació Y;12) i també en d'altres estudis prèviament publicats [Maya *et al.*, 2010; Strassberg *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012].

D'altra banda, és fonamental destacar la importància de realitzar estudis parentals sempre que es diagnostica prenatalment una reorganització cromosòmica, ja sigui microscòpica o críptica. Aquests estudis són fonamentals per a l'assessorament genètic familiar, ja que si un dels progenitors és portador de la reorganització, el risc de recurrència de l'anomalia (ja sigui en les seves formes equilibrada o desequilibrades) és molt elevat. Tots els protocols clínics actuals remarquen la importància de realitzar estudis parentals sempre que es diagnostica una reorganització cromosòmica microscòpica (equilibrada o desequilibrada); però cal remarcar que aquests estudis també són fonamentals quan es detecta una anomalia cromosòmica críptica, ja que les alteracions submicroscòpiques també poden ser conseqüència d'una reorganització cromosòmica familiar

[Bui *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a]. Vàries publicacions descriuen individus amb anomalies congènites i desequilibris subtelomèrics críptics que són el resultat de l'herència en desequilibri d'una reorganització cromosòmica subtelomèrica parental [Brackley *et al.*, 1999; Cavani *et al.*, 2003; Liehr *et al.*, 2004]; i estudis recents també han revelat que el 2,1% de les CNVs críptiques intersticials aparentment *de novo* són conseqüència de translocacions insercionals equilibrades en un dels progenitors [Nowakowska *et al.*, 2012]. Atès que els estudis de microarray no permeten diferenciar entre l'estat normal o de portador equilibrat d'una reorganització cromosòmica, la tècnica d'elecció per als estudis parentals hauria de ser, com a norma general, la FISH.

6. Perspectives de futur del diagnòstic citogenètic prenatal

Actualment, s'està discutint intensament quin paper han de jugar les tècniques de CMA en diagnòstic prenatal, i si caldria que reemplaressin la citogenètica convencional com a tècnica de primera elecció per a l'estudi de la majoria de gestacions que es sotmeten a un procediment invasiu. Els principals avantatges de la CMA són el seu potencial diagnòstic, superior al del cariotip per al conjunt d'indicacions clíniques de diagnòstic prenatal; que és una tècnica automatitzable; i que pot realitzar-se sense necessitat de cultiu cel·lular, permetent disposar dels resultats en una setmana i evitant possibles artefactes de cultiu [Zuffardi *et al.*, 2011; Strassberg *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012; Wapner *et al.*, 2012]. Però la CMA també presenta una sèrie de limitacions, la principal de les quals és la proporció de VOUS

detectades. És important tenir present, però, que s'espera que en els pròxims anys aquesta limitació es minimitzi gràcies a l'actualització constant de les bases de dades *on line* que reporten CNVs benignes i patogèniques (com la DGV, DECIPHER, ECARUCA, i ISCA) [Bui *et al.*, 2011; Strassberg *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2012; Breman *et al.*, 2012].

Una altra limitació de les tècniques de CMA és que no permeten el diagnòstic d'anomalies estructurals equilibrades, cromosomes marcadors supernumeraris sense eucromatina, i, en funció de la plataforma utilitzada, poliploïdies. Per tant, si la CMA s'implantés de forma rutinària com a *gold standard* de diagnòstic citogenètic prenatal, reemplaçant el cariotip, aquestes anomalies cromosòmiques deixarien de detectar-se. Estudis recents, en què s'han estudiat de manera prospectiva grans sèries prenatales mitjançant CMA i cariotip en paral·lel, han revelat que si únicament es realitzés CMA, el percentatge de gestacions amb alteracions cromosòmiques que deixarien de diagnosticar-se seria del 0,1-2% [Fiorentino *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Wapner *et al.*, 2012]. Si bé les poliploïdies no acostumen a arribar a terme, i la freqüència d'anomalies estructurals equilibrades i cromosomes marcadors sense eucromatina que s'associen amb anomalies congènites degut a disrupció gènica, efecte de posició i/o disomia uniparental és molt baixa (inferior a l'1%); el seu diagnòstic aporta una informació molt valuosa per a l'assessorament genètic i reproductiu de les famílies [Miller *et al.*, 2010; Zuffardi *et al.*, 2011; Savage *et al.*, 2011].

D'acord amb aquestes dades, un cop reduïda la proporció de VOUS detectades, el protocol ideal de diagnòstic prenatal seria la realització del cariotip i estudis de CMA en tota gestació que es sotmetés a un procediment invasiu. No obstant, donat que la concordança entre ambues tècniques és del 95,6% [Hillman *et al.*, 2011], i que realitzar cariotip i CMA a totes les gestacions suposaria un increment molt important del cost del diagnòstic prenatal; en un balanç cost-benefici aquesta estratègia probablement no seria sostenible per un sistema de salut públic i caldria escollir una de les dues metodologies. Valorant els avantatges i les limitacions de cadascuna d'elles, sembla que, arribat el moment, l'opció més adequada en diagnòstic prenatal seria oferir la CMA com a tècnica de primera elecció per a la majoria de gestacions que es sotmeten a un procediment invasiu.

Per a la implantació de la CMA en diagnòstic prenatal no hi ha limitacions tècniques i els criteris de qualitat per a l'anàlisi de resultats estan ben establerts [Fiegler *et al.*, 2006; Kearney *et al.*, 2011a, 2011b; Brady *et al.*, 2012; Vermeesch *et al.*, 2012], i és important destacar que recentment s'han publicat diverses sèries prenatales de mida considerable que han aportat informació molt valuosa en quant al potencial diagnòstic de la CMA enfront del cariotip en diagnòstic prenatal: Park *et al.* 2011 (N=4.073), Fiorentino *et al.* 2011 (N=1.037), Armengol *et al.* 2012 (N=906), Breman *et al.* 2012 (N=1.075), Lee *et al.* 2012 (N=3.171), Shaffer *et al.* 2012a (N=5.003), i Wapner *et al.* (2012) (N=4.406; publicació del projecte

‘Chromosomal Microarray Analysis for Prenatal Diagnosis: A Prospective Comparison with Conventional Cytogenetics’, finançat pel National Institute of Child health & Human Development als Estats Units). No obstant, abans de la recomanació de la utilització de plataformes de CMA com a *gold standard* del diagnòstic citogenètic prenatal, hi ha una sèrie d’aspectes que és necessari que siguin discutits i consensuats per la comunitat mèdica i científica, entre els quals cal destacar:

- Establir quina és la plataforma de CMA més adequada en diagnòstic prenatal. Si bé actualment la majoria de grups recomanen la utilització de plataformes *whole-genome* (enfront de les *targeted*), no està clar quina de les següents opcions és la més adient: array CGH, array SNP o array CGH+SNP. Les plataformes d’array SNP presenten una sèrie d’avantatges addicionals respecte a les plataformes d’array CGH: detecció d’isodisomies uniparentals (i heterodisomies si s’estudien les mostres parentals en paral·lel), diagnòstic de poliploïdies, major sensibilitat per detectar mosaics baixos i, especialment important en diagnòstic prenatal, bona capacitat de detecció de contaminació cel·lular materna. No obstant, també s’ha de tenir present que les plataformes d’array SNP poden revelar informació no desitjada (p.e. casos de no paternitat, consanguinitat o incest), i poden suposar un increment dels resultats de significat clínic incert [Schaaf *et al.*, 2011; Srebniak *et al.*, 2011].

- Determinar la resolució òptima de les plataformes de CMA en diagnòstic prenatal. Cal tenir present que augmentant la resolució es podrà diagnosticar una proporció més elevada de CNVs clínicament rellevants, però també s'incrementarà el nombre de VOUS detectades [Vermeesch *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012c].
- Valorar la necessitat de reportar aquelles CNVs patogèniques però associades amb malalties d'aparició tardana, infertilitat, predisposició a càncer o a malalties neurològiques [Strassberg *et al.*, 2011]. Actualment, aquesta qüestió és motiu de debat intens, especialment pels aspectes ètics als que està íntimament lligada. Per exemple, reportar aquestes CNVs en diagnòstic prenatal pot revelar informació parental (i d'altres familiars) i, d'altra banda, el coneixement d'informació genètica d'un individu que encara no ha nascut podria considerar-se una violació de la seva autonomia [Srebniak *et al.*, 2011]. En relació a com gestionar aquestes variants, en l'actualitat s'estan discutint les següents tres possibilitats: i) reportar-les en tots els casos, ii) només reportar-les quan hi hagi un benefici mèdic (p.e. tractament), i iii) que en l'assessorament genètic pretest la parella decideixi quina informació vol conèixer [Zuffardi *et al.*, 2011].
- Consensuar si cal reportar o no les delecions de gens recessius amb una elevada freqüència de portadors a la població [Vetro *et al.*, 2012].
- Determinar la necessitat de reportar les VOUS heretades probablement benignes [Zuffardi *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012]. Informar aquestes

variants incrementa la complexitat de l'assessorament genètic, augmenta l'ansietat parental i pot portar a la interrupció de gestacions sanes [Vermeesch *et al.*, 2011]. Si bé és cert que la presència d'una CNV heretada no és una evidència absoluta de benignitat, ni el fet que sigui *de novo* que s'hagi d'associar obligatòriament a anomalies fenotípiques; és més probable que una CNV *de novo* sigui patogènica que una d'heretada [Friedman, 2009; Zuffardi *et al.*, 2011; Breman *et al.*, 2012]. Sempre s'ha de tenir present, però, que un desequilibri heretat d'un progenitor fenotípicament normal pot associar-se a anomalies congènites degut als fenòmens de penetrància incompleta i expressivitat variable, i a la possible presència d'una mutació en un gen recessiu del cromosoma homòleg [Vetro *et al.*, 2012; Vermeesch *et al.*, 2012]. Shaffer *et al.* (2012a) han avaluat l'estratègia de no reportar aquelles VOUS que siguin heretades, i segons els seus resultats, la taxa de VOUS que caldria informar utilitzant aquest criteri es reduiria del 4,2% al 0,39%. Aquestes dades són consistents amb les taxes de VOUS reportades en els estudis de Fiorentino *et al.* (2011) i Lee *et al.* (2012) (0 i 0,2%, respectivament), en què s'han utilitzat criteris similars.

- Determinar la necessitat de disposar de DNA parental en el moment de realitzar els estudis de CMA fetals. Si en el moment de realització del procediment invasiu de diagnòstic prenatal també s'obtinguessin mostres parentals, es podria oferir una interpretació més precisa de les CNVs detectades en un període breu de temps, un factor crucial en

diagnòstic prenatal [Vetro *et al.*, 2012]. Disposar de DNA parental en el moment de l'anàlisi dels resultats seria indispensable si s'optés per no informar aquelles VOUS heretades.

Un altre element essencial en el que també cal seguir investigant és en els criteris de selecció d'aquelles gestacions amb un risc incrementat d'anomalia cromosòmica, tant microscòpica com críptica, per tal de maximitzar el nombre de diagnòstics realitzant el mínim de procediments invasius possibles. Els criteris actualment vigents han estat dissenyats per al diagnòstic d'anomalies cromosòmiques microscòpiques, i d'una forma molt especial per a la detecció de trisomia 21. Nombrosos estudis han demostrat que les anomalies ecogràfiques constitueixen una bona indicació per a la realització d'estudis de CMA [Armengol *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a; Wapner *et al.*, 2012]; però és important seguir treballant en aquest camp, tant per determinar quines són les troballes ecogràfiques que s'associen més freqüentment a anomalies cromosòmiques críptiques, com per establir si existeixen marcadors bioquímics que es vegin alterats en gestacions amb anomalies submicroscòpiques.

D'altra banda, és molt probable que d'aquí a uns anys la realització d'un cribratge fetal de les anomalies cromosòmiques més comuns en sang materna de forma rutinària a totes les gestants sigui una realitat, fet que permetria una cobertura de la població molt més àmplia i reduir el nombre de procediments invasius que caldria realitzar. Donat que els estudis en plasma matern sembla que estaran destinats bàsicament al diagnòstic de

les aneuploïdies clàssiques, el cariotip i/o la CMA continuaran tenint un paper important en diagnòstic prenatal, especialment per a l'estudi d'aquelles gestacions amb anomalies ecogràfiques fetals o anomalies cromosòmiques parentals [Vetro *et al.*, 2012]. El cariotip i/o la FISH també seran indispensables per a poder establir una localització cromosòmica dels desequilibris cromosòmics diagnosticats per CMA, una informació essencial per a l'assessorament genètic familiar.

Finalment, és molt important tenir present que l'assessorament genètic pretest i posttest és fonamental sempre que es realitza un estudi genètic, i aquest procés és especialment delicat durant l'etapa prenatal. De la informació proporcionada en poden dependre decisions molt importants per a una parella, tant sobre la gestació en curs (p.e. interrupció legal de l'embaràs) com per a la planificació de futures gestacions [Faas *et al.*, 2010; Strassberg *et al.*, 2011; Vetro *et al.*, 2012]. Atès que l'assessorament genètic dels estudis de CMA és complex, per a la implantació de les tècniques de CMA de forma generalitzada en diagnòstic prenatal resulta imprescindible la presència de professionals en el camp de la genètica clínica amb àmplia experiència en la interpretació dels resultats obtinguts mitjançant aquesta tecnologia.

CONCLUSIONS

1. El cariotip és una eina robusta i efectiva de diagnòstic citogenètic prenatal, que permet el diagnòstic d'anomalies cromosòmiques en el 2,9% de les gestacions que se sotmeten a un procediment invasiu de segon trimestre de la gestació.
2. Les anomalies ecogràfiques i la translucidesa nugal incrementada destaquen com a indicadors excel·lents d'anomalies cromosòmiques microscòpiques fetals, amb valors predictius positius del 6,6% i 9,2%, respectivament. A més, no únicament són bons indicadors de gestacions amb trisomia 21, sinó també d'altres alteracions cromosòmiques menys freqüents que comporten guany i/o pèrdua de material genètic.
3. El cribratge de les regions subtelomèriques (p.e. mitjançant MLPA) no constitueix un element fonamental per al diagnòstic prenatal de gestacions amb troballes ecogràfiques i cariotip normal, ja que en aquest grup de gestacions la taxa de detecció de desequilibris subtelomèrics clínicament rellevants és baixa i la correlació genotip-fenotip és pobre.
4. En gestacions amb troballes ecogràfiques cardíques:
 - a. La taxa de detecció d'anomalies cromosòmiques microscòpiques és del 15,9% (17,6% si s'exclouen els marcadors ecogràfics cardíacs), i és especialment elevada en presència d'anomalies extracardíiques.

- b. La freqüència de la Síndrome de la deleció cromosòmica 22q11.2 en aquelles gestacions en què el cariotip és normal i es sol·licita estudi de FISH de la regió 22q11.2 és del 6,4%.
- c. Els estudis de FISH de la regió 22q11.2 són preferibles a l'MLPA dissenyada per a l'anàlisi de regions genòmiques associades a cardiopaties sindròmiques, ja que presenten un temps d'entrega de resultats més curt, unes taxes de repetició i no obtenció de resultats inferiors, i desequilibris diferents de la microdeleció 22q11.2 típica són infreqüents en fetus amb malformacions cardíaques.
- d. En gestacions amb troballes cardíaques fetals i cariotip normal, la utilització d'una plataforma d'array CGH dirigida amb *backbone* a una resolució d'1Mb permetria incrementar un 2% la detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants, sense un augment en la proporció de VOUS. Per tant, la realització d'estudis de CMA en aquest grup de gestacions és altament recomanable.
- e. La utilització de l'estratègia QF-PCR + CMA enlloc de cariotip en les 276 gestacions amb troballes ecogràfiques cardíaques de la sèrie aquí presentada hagués permès la detecció de totes les anomalies clínicament rellevants diagnosticades al cariotip i les microdeleccions a 22q11.2; i hagués incrementat un 2% la detecció d'anomalies cromosòmiques clínicament rellevants. Aquests resultats suggereixen que aquesta estratègia podria ser una

alternativa molt atractiva al cariotip convencional en el diagnòstic prenatal de troballes ecogràfiques cardíaques fetals.

- f. Quant a les troballes ecogràfiques cardíaques amb valors predictius positius més elevats per a la detecció d'alteracions cromosòmiques, cal destacar la forta associació observada entre cor esquerre hipoplàsic i anomalies cromosòmiques, ja siguin microscòpiques o críptiques.
5. Les tècniques de citogenètica molecular FISH, MLPA i CMA són de gran utilitat per a la caracterització d'anomalies cromosòmiques diagnosticades per citogenètica convencional durant l'etapa prenatal, i aquesta informació és essencial per a poder proporcionar un assessorament genètic acurat. Concretament:
- a. La FISH permet la localització geogràfica de les reorganitzacions cromosòmiques, tant equilibrades com desequilibrades.
 - b. L'MLPA subtelomèrica és de gran utilitat per a la correcta descripció de reorganitzacions cromosòmiques desequilibrades.
 - c. La CMA destaca com a eina fonamental per a l'estudi de gestacions on el cariotip mostra reorganitzacions cromosòmiques estructurals *de novo* aparentment equilibrades, permetent determinar de forma ràpida i eficaç la presència de desequilibris críptics en els punts de trencament. La realització d'estudis de CMA en aquestes gestacions és altament recomanable, independentment de la presència d'anomalies ecogràfiques fetals.

6. Els estudis parentals són fonamentals sempre que es diagnostica prenatalment una reorganització cromosòmica, ja sigui microscòpica o críptica, per tal de poder oferir un assessorament genètic acurat.
7. L'estudi realitzat reflexa la complexitat del diagnòstic i de l'assessorament genètic de les anomalies cromosòmiques durant l'etapa prenatal, i posa de manifest la necessitat de professionals amb àmplia experiència en el camp de la genètica, tant en el laboratori com en l'àmbit clínic. L'assessor genètic destaca com a figura imprescindible per a la correcta emissió de l'assessorament genètic, que és l'única mesura preventiva d'aquelles alteracions cromosòmiques que s'associen a anomalies congènites.

BIBLIOGRAFIA

- ACOG. ACOG Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2009;114(5):1161-3.
- Adkison LR, Brown MD. 2007. Elsevier's Integrated Genetics. First Edition. Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, et al. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet.* 2012;131(3):513-23.
- Baena N, De Vigan C, Cariati E, et al. Prenatal detection of rare chromosomal autosomal abnormalities in Europe. *Am J Med Genet A.* 2003;118(4):319-327.
- Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008;10(6):415-29.
- Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A.* 2006;140(24):2757-67.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, et al. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):927-36.
- Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, et al. The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N Engl J Med.* 1994;330(13):885-91.
- Bellucco FT, Belangero SI, Farah LM, et al. Investigating 22q11.2 deletion and other chromosomal aberrations in fetuses with heart defects detected by prenatal echocardiography. *Pediatr Cardiol.* 2010;31(8):1146-50.
- Borrell A, Casals E, Fortuny A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study.

- Prenat Diagn. 2004;24(7):541-5.
- Borrell A, Costa D, Delgado RD, et al. Transcervical chorionic villus sampling beyond 12 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996;7(6):416-20.
- Borrell A, Fortuny A, Lazaro L, et al. First-trimester transcervical chorionic villus sampling by biopsy forceps versus mid-trimester amniocentesis: a randomized controlled trial project. *Prenat Diagn.* 1999;19(12):1138-42.
- Brackley KJ, Kilby MD, Morton J, Whittle MJ, Knight SJ, Flint J. A case of recurrent congenital fetal anomalies associated with a familial subtelomeric translocation. *Prenat Diagn.* 1999;19(6):570-4.
- Brady PD, Devriendt K, Deprest J, Vermeesch JR. Array-based approaches in prenatal diagnosis. *Methods Mol Biol.* 2012;838:151-71.
- Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, et al. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J Pediatr.* 2010;156(5):810-7.
- Breman A, Pursley AN, Hixson P, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):351-61.
- Brent RL, Beckman DA, Landel CP. Clinical teratology. *Curr Opin Pediatr.* 1993;5(2):201-11.
- Bretelle F, Beyer L, Pellissier MC, et al. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet.* 2010;53(6):367-70.
- Bui TH, Vetro A, Zuffardi O, Shaffer LG. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era? *Prenat Diagn.* 2011;31(3):235-43.
- Bulbul ZR, Rosenthal D, Brueckner M. Genetic aspects of heart disease in the newborn. *Semin Perinatol.* 1993;17(2):61-75.

- Cai G, Edelmann L, Goldsmith JE, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Med Genomics*. 2008;1:50.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 1970;60:315-9.
- Cavani S, Perfumo C, Faravelli F, et al. Cryptic 1p36.3/6q25.2 translocation in three generations ascertained through a foetus with IUGR and cerebral malformations. *Prenat Diagn*. 2003;23(10):819-23.
- Chagnon P, Schneider R, Hébert J, et al. Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1270-8.
- Chaoui R, Körner H, Bommer C, Göldner B, Bierlich A, Bollmann R. Prenatal diagnosis of heart defects and associated chromosomal aberrations. *Ultraschall Med*. 1999;20(5):177-84.
- Chen Y, Chen G, Lian Y, Gao X, Huang J, Qiao J. A normal birth following preimplantation genetic diagnosis by FISH determination in the carriers of der(15)t(Y;15)(Yq12;15p11) translocations: Two case reports. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24:483-8.
- Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011;342:c7401.
- Comas Gabriel C, Galindo A, Martínez JM, et al. Early prenatal diagnosis of major cardiac anomalies in a high-

- risk population. *Prenat Diagn* 2002;22(7):586-93.
- Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, Torchia BS, Bejjani BA, Shaffer LG. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn*. 2009;29(12):1156-66.
- Crolla JA, Youngs SA, Ennis S, Jacobs PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(2):154-60.
- D'Amours G, Kibar Z, Mathonnet G, et al. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. *Clin Genet*. 2012;81(2):128-41.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet*. 2007;44(12):750-62.
- de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat*. 2012;33:930-940.
- De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*. 2003;40(6):385-98.
- Drets M, Shaw M. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68:2073-7.
- Dugoff L, Hobbins JC. Invasive procedures to evaluate the fetus. *Clin Obstet Gynecol*. 2002;45(4):1039-53.
- Duncan A, Langlois S; SOGC Genetics Committee; CCMG Prenatal Diagnosis Committee. Use of array genomic hybridization technology in prenatal diagnosis in Canada. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011;33(12):1256-9.

- Durban M, Benet J, Boada M, et al. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update*. 2001;7:591-602.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, et al. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet*. 1999;8(7):1157-67.
- Edwards J, Harnden D, Cameron A, Crosse VM, Wolf OH. A new trisomic syndrome. *Lancet*. 1960;1:787-90.
- Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet*. 2008;45(11):704-9.
- Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, et al. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet*. 2010;3:24.
- Faas BH, Cirigliano V, Bui TH. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16(2):81-7.
- Faas BH, Feenstra I, Eggink AJ, et al. Non-targeted whole genome 250K SNP array analysis as replacement for karyotyping in fetuses with structural ultrasound anomalies: evaluation of a one-year experience. *Prenat Diagn*. 2012;32(4):362-70.
- Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, et al. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet*. 2010;47(9):586-94.

- Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, et al. Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(11):1152-60.
- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2005;68(4):373-8.
- Fiegler H, Redon R, Andrews D, et al. Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. *Genome Res.* 2006;16(12):1566-74.
- Filges I, Kang A, Klug V, et al. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis of first trimester pregnancies at high risk for chromosomal anomalies. *Mol Cytogenet.* 2012;5(1):38.
- Fiorentino F, Caiazzo F, Napolitano S, et al. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases. *Prenat Diagn.* 2011;31(13):1270-82.
- Ford CE, Hamerton JL. The chromosomes of man. *Nature.* 1956;178:1020-3.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1959;1(7075):711-3.
- Freedom RM, Gerald PS. Congenital cardiac disease and the "cat eye" syndrome. *Am J Dis Child.* 1973;126(1):16-18.
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res.* 2006;16(8):949-61.
- Freinkel N. Diabetic embryopathy and fuel-mediated organ teratogenesis: lessons from animal models. *Horm Metab Res.* 1988;20(8):463-75.

- Friedman JM. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2009;29:20-8.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(7):539-47.
- Gardner RJ, Sutherland GR, Shaffer LG. 2012. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling.* Fourth Edition. New York: Oxford University Press.
- Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003;424(6947):443-7.
- Gembruch U, Baschat AA, Knöpfle G, Hansmann M. Results of chromosomal analysis in fetuses with cardiac anomalies as diagnosed by first- and early second-trimester echocardiography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997;10(6):391-6.
- Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations. *Am J Med Genet A.* 2006;140A:2768-75.
- Gijsbers AC, Bosch CA, Dauwese JG, et al. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur J Med Genet.* 2010;53(5):227-33.
- Go AT, van Vugt JM, Oudejans CB. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update.* 2011;17(3):372-82.
- Goidts V, Cooper DN, Armengol L, et al. Complex patterns of copy number variation at sites of segmental duplications: an important category of structural variation in the human genome. *Hum Genet.* 2006;120(2):270-84.

- Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod.* 2012;27(7):1887-911.
- Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet.* 2009;41(8):931-5.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* 2005;42(1):8-16.
- Gruchy N, Decamp M, Richard N, et al. Array CGH analysis in high-risk pregnancies: comparing DNA from cultured cells and cell-free fetal DNA. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):383-8.
- Gruchy N, Lebrun M, Herlicoviez M, et al. Supernumerary marker chromosomes management in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(21):2770-6.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008;1(1):4.
- Han SH, An JW, Jeong GY, et al. Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med.* 2008;28(5):378-85.
- Harper PS. 2004. *Practical Genetic Counselling.* Sixth Edition. New York: Oxford University Press.
- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):712-22.
- Hiippala A, Eronen M, Taipale P, Salonen R, Hiilesmaa V. Fetal nuchal translucency and normal chromosomes: a long-term follow-up study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;18(1):18-22.

- Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):6-14.
- Hobbins JC, Mahoney MJ, Goldstein LA. New method of intrauterine evaluation by the combined use of fetoscopy and ultrasound. *Am J Obstet Gynecol.* 1974;118:1069-72.
- Holt M, Oram S. Familial heart disease with skeletal malformations. *Br Heart J.* 1960;22:236-42.
- Honda H, Miharuru N, Samura O, He H, Ohama K. Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 2000;106:188-93.
- Hook EB, Hamerton JL. Analyses of data on rates of cytogenetic disorders in live births. *Am J Hum Genet.* 1978;30(3):330-1.
- Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977;29(1):94-7.
- Hyett J, Moscoso G, Nicolaides K. Abnormalities of the heart and great arteries in first trimester chromosomally abnormal fetuses. *Am J Med Genet.* 1997;69(2):207-16.
- Hyett JA, Moscoso G, Nicolaides KH. Cardiac defects in 1st-trimester fetuses with trisomy 18. *Fetal Diagn Ther.* 1995;10(6):381-6.
- Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004;36(9):949-51.
- Ireland JW, Jalal SM, McGrann PS, Lindor NM. Nonmosaic smallest duplication of 12q24.31-qter: The first reported case. *Am J Med Genet Part A.* 2004;128A:305-10.
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of

- the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992;29(2):103-8.
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 1959;183:302-3.
- Jacobson CB, Barter RH. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol.* 1967;99(6):796-807.
- Jalali GR, Vorstman JA, Errami A, et al. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat.* 2008;29(3):433-40.
- Jang SK, Choi OH. Cytogenetic and clinical analysis in 3537 cases of midtrimester amniocentesis. *Korean J Perinatol.* 2007;18:29-36.
- Janssen N, Bergman JE, Swertz MA, et al. Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Hum Mutat.* 2012;33(8):1149-60.
- Johnson B, Simpson LL. Screening for congenital heart disease: a move toward earlier echocardiography. *Am J Perinatol.* 2007;24(8):449-56.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818-21.
- Karaoguz MY, Bal F, Yakut T, et al. Cytogenetic results of amniocentesis materials: incidence of abnormal karyotypes in the Turkish collaborative study. *Genet Couns.* 2006;17(2):219-30.
- Kearney HM, South ST, Wolff DJ, et al. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med.* 2011a;13(7):676-9.

- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011b;13(7):680-5.
- Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, et al. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn.* 2009;29(13):1213-7.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009;30(3):283-92.
- Krantz ID, Rand EB, Genin A, et al. Deletions of 20p12 in Alagille syndrome: frequency and molecular characterization. *Am J Med Genet.* 1997;70(1):80-86.
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W. Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res.* 2001;9(3):215-22.
- Lacro RV. 2000. Genetics of congenital cardiovascular malformations. In: Allan L, Hornberger LK, Sharland G eds. *Textbook of fetal echocardiography.* London: Greenwich Medical Media.
- Lars F. 2012. Genomic Structural Variants: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology.* Vol. 838, pp 151-171. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* 2005;42(2):121-8.

- Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG*. 2012;119(5):614-25.
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, et al. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1963;257:3098-102.
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Acad Sci*. 1959;248:1721-2.
- Leung TY, Vogel I, Lau TK, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38(3):314-9.
- Li P, Pomianowski P, DiMaio MS, et al. Genomic characterization of prenatally detected chromosomal structural abnormalities using oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(7):1605-15.
- Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem*. 2010;50:279-96.
- Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*. 2004;107(1-2):55-67.
- Liehr T, Ewers E, Hamid AB, et al. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(9):842-8.
- Liehr T, Ewers E, Kosyakova N, et al. Handling small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009a;9(4):317-24.
- Liehr T. 2009b. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Liyange M, Coleman A, du Manoir S, et al. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet.* 1996;14:312–5.
- Ljunger E, Stavreus-Evers A, Cnattingius S, et al. Ultrasonographic findings in spontaneous miscarriage: relation to euploidy and aneuploidy. *Fertil Steril.* 2011;95(1):221-4.
- Manji S, Roberson JR, Wiktor A, et al. Prenatal diagnosis of 22q11.2 deletion when ultrasound examination reveals a heart defect. *Genet Med.* 2001;3(1):65-6.
- Marino B, Digilio MC, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: An expanded cardiac spectrum with high prevalence of atrioventricular canal. *J Pediatr.* 1999;135(6):703-6.
- Martens MA, Wilson SJ, Reutens DC. Research Review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype. *J Child Psychol Psychiatry.* 2008;49(6):576-608.
- Masuno M, Fukushima Y, Sugio Y, Kuroki Y. Partial distal 12q trisomy with arachnoid cyst. *Jinrui Idengaku Zasshi.* 1987;32:39–43.
- Maya I, Davidov B, Gershovitz L, et al. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenat Diagn.* 2010; 30(12-13):1131-7.
- Mazzanti L, Cacciari E. Congenital heart disease in patients with Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner Syndrome (ISGTS). *J Pediatr.* 1998;133(5):688-92.
- McElhinney DB, Krantz ID, Bason L, et al. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation.* 2002;106(20):2567-74.
- Milewicz DM. Molecular genetics of Marfan syndrome and Ehlers-

- Danlos type IV. *Curr Opin Cardiol.* 1998;13(3):198-204.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, 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(5):749-64.
- Mohr J. Foetal genetic diagnosis: development of techniques for early sampling of foetal cells. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1968;73(1):73-7.
- Morales C, Mademont-Soler I, Armengol L, et al. Characterization of a 5.8-Mb interstitial deletion of chromosome 3p in a girl with 46,XX,inv(7)dn karyotype and phenotypic abnormalities. *Cytogenet Genome Res.* 2009;125(4):334-40.
- Morales C, Sánchez A, Bruguera J, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(1):66-70.
- Nicolaides KH, Snijders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet.* 1992;340(8821):704-7.
- Niyazov DM, Nawaz Z, Justice AN, Toriello HV, Martin CL, Adam MP. Genotype/phenotype correlations in two patients with 12q subtelomere deletions. *Am J Med Genet Part A.* 2007;143A:2700-5.
- Novelli A, Grati FR, Ballarati L, et al. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(4):384-8.
- Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CA, et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with

- developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(2):166-70.
- Pajkrt E, Weisz B, Firth HV, Chitty LS. Fetal cardiac anomalies and genetic syndromes. *Prenat Diagn.* 2004;24(13):1104-15.
- Paladini D, Russo M, Teodoro A, et al. Prenatal diagnosis of congenital heart disease in the Naples area during the years 1994-1999 -- the experience of a joint fetal-pediatric cardiology unit. *Prenat Diagn.* 2002;22(7):545-52.
- Paladini D, Tartaglione A, Agangi A, et al. The association between congenital heart disease and Down syndrome in prenatal life. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000;15(2):104-8
- Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med.* 2011;17(4):510-3.
- Park SJ, Jung EH, Ryu RS, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Mol Cytogenet.* 2011;4:12.
- Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorm SL, Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet.* 1960;1:790-3.
- Patil S, Merrick S, Lubs H. Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. *Science.* 1971;173:821-2.
- Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115(23):3015-38.
- Pinho MJ, Neves R, Costa P, et al. Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a

- male with azoospermia due to meiotic arrest: A case report. *Hum Reprod.* 2005;20:689-96.
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labelled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:151-7.
- Platt LD, Koch R, Azen C, et al. Maternal phenylketonuria collaborative study, obstetric aspects and outcome: the first 6 years. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(4):1150-60.
- Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals. Primera edició. Barcelona: Direcció General de Salut Pública. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya; 2008.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006;43(6):478-89.
- Reynolds JF, Daniel A, Kelly TE, et al. Isochromosome 12p mosaicism (Pallister mosaic aneuploidy or Pallister-Killian syndrome): report of 11 cases. *Am J Med Genet.* 1987;27(2):257-74.
- Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res.* 2008;64(4):358-63.
- Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet.* 2006;43(4):353-61.
- Rosenfeld JA, Amrom D, Andermann E, et al. Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics.* 2012;13(1):31-47.
- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array

- CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009;11(3):139-46.
- Sahoo T, Cheung SW, Ward P, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med.* 2006;8(11):719-27.
- Sandor GG, Smith DF, MacLeod PM. Cardiac malformations in the fetal alcohol syndrome. *J Pediatr.* 1981;98(5):771-3.
- Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):182-95.
- Savage MS, Mourad MJ, Wapner RJ. Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011;23(2):103-8.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:25-51.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* 2009;52(5):291-6.
- Schmid M, Stary S, Blaicher W, Gollinger M, Husslein P, Streubel B. Prenatal genetic diagnosis using microarray analysis in fetuses with congenital heart defects. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):376-82.
- Schneider A, Benzacken B, Guichet A, et al. Molecular cytogenetic characterization of terminal 14q32 deletions in two children with an abnormal phenotype and corpus callosum hypoplasia. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(6):680-7.
- Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan

- syndrome. *Nat Genet.* 2006;38(3):331-6.
- Scott SA, Cohen N, Brandt T, Toruner G, Desnick RJ, Edelmann L. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Genet Med.* 2010;12(2):85-92.
- Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, et al. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn.* 2008;28(9):789-95.
- Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2012a;32(10):976-85.
- Shaffer LG, Dabell MP, Rosenfeld JA, et al. Referral patterns for microarray testing in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2012c;32(6):611.
- Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet.* 2000;34:297-329.
- Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn.* 2012b;32(10):986-95.
- Shao L, Shaw CA, Lu XY, et al. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(17):2242-51.
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet.* 1983;63:349-57.
- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal

- phenotype. *Mol Cytogenet.* 2008;1:15.
- Soler A, Clusellas N, Mademont I, Morales C, Margarit E, Sánchez A. El diagnóstico citogenético prenatal aquí y ahora. Validez actual y futura del cariotipo. *Progr Diag Trat Prenat.* 2009;21(4):187-92.
- Soler-Casas A, Sánchez-Díaz A, Morales-Peydró C. The impact of prenatal diagnosis on the prevention of chromosomal mental retardation. Chromosomal alterations that can be detected by prenatal diagnosis. *Rev Neurol.* 2006;42 Suppl 1:S27-32.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;20(4):399-407.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996;12:368-75.
- Speleman F, Van Roy N, De Vos E, Hilliker C, Suijkerbuijk RF, Leroy JG. Molecular cytogenetic analysis of a familial pericentric inversion of chromosome 12. *Clin Genet.* 1993;44:156-63.
- Srebniak M, Boter M, Oudesluijs G, et al. Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: implementation, genetic counselling and diagnostic flow. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(12):1230-7.
- Srebniak MI, Boter M, Oudesluijs GO, et al. Genomic SNP array as a gold standard for prenatal diagnosis of foetal ultrasound abnormalities. *Mol Cytogenet.* 2012;5(1):14.
- Stachon AC, Baskin B, Smith AC, et al. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(24):2924-30.
- Staebler M, Donner C, Van Regemorter N, et al. Should determination of the karyotype be systematic for all

- malformations detected by obstetrical ultrasound? *Prenat Diagn.* 2005;25(7):567-73.
- Steele MW, Breg WR. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet.* 1966;1:383.
- Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet.* 2008;51(2):93-105.
- Stoll C, Clementi M; Euroscan study group. Prenatal diagnosis of dysmorphic syndromes by routine fetal ultrasound examination across Europe. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003;21(6):543-51.
- Strassberg M, Fruhman G, Van den Veyver IB. Copy-number changes in prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11(6):579-92.
- Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(1):19-24.
- Tajara EH, Varella-Garcia M, Gusson AC. Partial trisomy 12q24.31----qter. *J Med Genet.* 1985;22(1):73-6.
- Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(1):75-9.
- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J.* 2007;28(22):2778-84.
- Tjio J, Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas.* 1956;42:1-6.
- Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat

- phaeochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol.* 2006;70(1):319-28.
- Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, Chen MH, Ho ES. Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995–2004. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2006;45:39-41.
- Tsuchiya KD, Opheim KE, Hannibal MC, et al. Unexpected structural complexity of supernumerary marker chromosomes characterized by microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet.* 2008;1:7.
- Tyreman M, Abbott KM, Willatt LR, et al. High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *J Med Genet.* 2009;46(8):531-41.
- Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, et al. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn.* 2010;30(4):333-41.
- Valenti C, Schutta EJ, Kehaty T. Prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet.* 1968;2(7561):220.
- Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn.* 2009;29(1):29-39.
- van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, et al. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet.* 2002b;39(8):546-53.
- van Karnebeek CD, Quik S, Sluijter S, Hulsbeek MM, Hoovers JM, Hennekam RC. Further delineation of the chromosome 14q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet.* 2002a;110(1):65–72.
- Van Opstal D, Boter M, de Jong D, et al. Rapid aneuploidy detection with multiplex

- ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(1):112-21.
- Vermeesch JR, Balikova I, Schrandt-Stumpel C, Fryns JP, Devriendt K. The causality of de novo copy number variants is overestimated. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(11):1112-3.
- Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 2012;33(6):906-15.
- Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(11):1105-14.
- Vetro A, Bouman K, Hastings R, et al. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: A special challenge. *Hum Mutat.* 2012;33(6):923-9.
- Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, et al. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther.* 2009;25(2):277-84.
- Visoosak J, Graham JM Jr. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1(42):1-5.
- Vissers LE, Bhatt SS, Janssen IM, et al. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. *Hum Mol Genet.* 2009;18(19):3579-93.
- Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat.* 2006;27(8):814-21.
- Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements

- and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991;49(5):995-1013.
- Willis AS, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):315-20.
- Wimalasundera RC, Gardiner HM. Congenital heart disease and aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2004;24(13):1116-22.
- Yang C, Zhu X, Yi L, et al. Comparative study of three PCR-based copy number variant approaches, CFMSA, M-PCR, and MLPA, in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(6):803-8.
- Yu S, Fiedler SD, Brawner SJ, Joyce JM, Zhou XG, Liu HY. Characterizing small supernumerary marker chromosomes with combination of multiple techniques. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(1):6-14.
- Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet.* 2009;41(7):849-53.
- Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):205-14.
- Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011;16(2):94-8.

RECURSOS ON LINE:

Base de dades on line de SMCs creada per Thomas Liehr;
<http://www.fish.uniklinikum-jena.de/sSMC.html>

DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*); <http://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV (*Database of Genomic Variants*); <http://projects.tcag.ca/variation/>

ECARUCA (*European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*); <http://www.ecaruca.net>

ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium*);
<https://www.iscaconsortium.org/>

OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*);
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

UCSC Genome Browser (*University of California Santa Cruz Genome Browser*); <http://genome.ucsc.edu/>

