

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. FRANCISC MIXICH

STUDENT-DOCTORAND:
SIMONA ȘERBAN-ȘOȘOI

CRAIOVA
2015

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



UTILITATEA TEHNICILOR CITOGENETICE
(CLASICE ȘI MOLECULARE) ÎN DIAGNOSTICUL
PRE- ȘI POSTNATAL

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. FRANCISC MIXICH

STUDENT-DOCTORAND:
SIMONA ȘERBAN-ȘOȘOI

CRAIOVA
2015

CUPRINS

INTRODUCERE	1
Partea I – STADIUL CUNOAȘTERII	2
Capitolul 1 – Diagnosticul prenatal	2
1.1. Cadru general	2
1.2. Screening-ul prenatal	3
1.3. Diagnosticul genetic prenatal	4
Capitolul 2 – Array CGH în diagnosticul pre- și postnatal	24
2.1. Principii generale	24
2.2. Alegerea platformei array CGH și a probei fetale pentru diagnosticul prenatal	27
2.3. Interpretarea rezultatelor array CGH în contextul diagnosticului prenatal	28
Capitolul 3 – Consilierea genetică și diagnosticul prenatal	31
3.1. Istoric	31
3.2. Consilierea pretestare și consimțământul părinților în diagnosticul prenatal	31
3.3. Comunicarea între laborator și clinician	35
Partea a II-a – CONTRIBUȚII PROPRII	37
Capitolul 4 – Scopul și obiectivele studiului	37
Capitolul 5 – Materiale și metode	39
5.1. Stabilirea lotului și includerea pacienților în studiu	39
5.2. Recoltarea materialului biologic	40
5.3. Evaluarea genetică prin cariotipare convențională (bandare GTG)	40
5.4. Identificarea variantelor patologice prin tehnologia array CGH	45
Capitolul 6 – Rezultate și discuții	60
Capitolul 7 – Concluzii finale	128
Bibliografie	130
Anexe	149

Cuvinte cheie: array CGH, citogenetică clasică, diagnostic prenatal, microdeleții, microduplicații

INTRODUCERE

Sarcina este procesul fiziologic caracterizat în același timp de rezistență (din majoritatea sarcinilor duse la termen rezultă nou-născuți vii cu structură genetică integră) și vulnerabilitate (un procent din producții de concepție prezintă modificări de număr sau structură ale materialului genetic care, în funcție de amplitudine, pot duce la pierderea sarcinii). Impactul puternic al patologiei malformative și genetice fetale atât asupra familiei, cât și asupra societății, a captat atenția medicinei moderne, făcând din patologia sarcinii un domeniu de interes major pentru specialiști.

Diagnosticul pre- și postnatal urmărește depistarea modificărilor materialului genetic și a malformațiilor congenitale.

Modificările materialului genetic pot fi: benigne, cu potențial patogen ridicat, sau letale. În ultimul deceniu, interesul specialiștilor din domeniu s-a îndreptat spre dezvoltarea metodelor și tehnicilor de screening și diagnostic prenatal al patologiei genetice fetale. În acest context, acest studiu și-a propus perfecționarea cadrului organizatoric al diagnosticului prenatal la nivel regional prin atingerea a două obiective principale:

1. Evaluarea prin tehnici genetice (clasice și moleculare) a cazurilor cu anomalii depistate prin screening prenatal și realizarea unor corelații între metodele de screening și diagnostic.
2. Stabilirea corelației dintre modificările genetice identificate pre- și / sau postnatal și fenotip, analizând potențialul folosirii tehnicii de hibridizare genomică comparativă în diagnosticul genetic prenatal din România.

Implicațiile de ordin economic, social și psihologic (mortalitate perinatală crescută, dizabilități motorii sau intelectuale importante, anxietate, depresie, stigmatizare) justifică scopul și obiectivele studiului.

I. STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul 1, intitulat “*Diagnosticul prenatal*”, descrie metodele de screening prenatal, indicațiile diagnosticului genetic prenatal, metodele invazive de diagnostic prenatal și tehnicile citogenetice, respectiv moleculare, clasice și de nouă generație, folosite în cadrul testării prenatale.

În cadrul *capitolului 2*, intitulat “*Array-CGH în diagnosticul pre- și postnatal*”, sunt prezentate principiile generale ale tehnicii de hibridizare genomică comparativă bazată pe microarray, criteriile de alegere ale platformei de array și tipurile de probe folosite, precum și dificultățile interpretării rezultatelor, în special în cadrul diagnosticului prenatal.

Capitolul 3, intitulat “*Consilierea genetică și diagnosticul prenatal*”, descrie istoricul consilierii genetice, necesitatea consilierii pretestare și obținerii consimțământului părinților în diagnosticul prenatal și, de asemenea, importanța abordării multidisciplinare a acestui subiect, prin stabilirea unei bune colaborări între specialiști (genetician, medic de laborator, obstetrician, etc).

II. CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul 4. Scopul și obiectivele studiului

Ne-am propus evaluarea prenatală sau postnatală prin array CGH și / sau cariotipare convențională a sarcinilor considerate a avea un risc crescut pentru anomalii genetice, respectiv a copiilor cu un tablou clinic sugestiv pentru sindroame genetice.

Capitolul 5. Material și metode

În acest studiu au fost incluse 23 de cazuri prenatale și postnatale cu suspiciune de afecțiune genetică pe baza rezultatelor evaluării clinice, imagistice, screening-ului ecografic și biochimic prenatal. Cazurile cuprinse în acest studiu au fost evaluate în Unitatea de Diagnostic Prenatal a Departamentului de Obstetrică-Ginecologie al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, în Clinica de Pediatrie și în Cabinetul de Genetică Medicală din Ambulatoriul acestei instituții medicale, precum și în Laboratorul de Genomică Umană al UMF Craiova (LGU).

Proble biologice au fost reprezentate de sânge venos periferic, lichid amniotic, biopsie de vilozități coriale și fragmente de țesut fetal.

S-a realizat evaluarea fie prin metoda citogenetică clasică (cariotiparea convențională), fie prin metoda moleculară (array CGH), iar în unele cazuri prin asocierea celor 2 tehnici (efectuate în Laboratorul de Genomică Umană - LGU).

Evaluarea prin cariotipare convențională a necesitat probe biologice proaspăt recoltate și păstrate în condiții corespunzătoare pentru a iniția culturile celulare, în vederea obținerii cromozomilor și analizarea acestora la microscop.

Pentru metoda array CGH s-au folosit atât probe proaspete, cât și probe congelate, din care a fost izolat ADN-ul, purificat, evaluat apoi din punct de vedere al calității, marcat fluorescent și hibridizat pe lame speciale pentru microarray.

Capitolul 6. Rezultate și discuții

Primul caz evaluat genetic a prezentat atât modificări biochimice, cât și ecografice în cadrul screening-ului prenatal. Inițial, a fost investigat prin metoda citogenetică clasică și apoi evaluat prin array CGH. Pacientul a prezentat o deleție interstițială a brațului scurt al cromozomului 10.

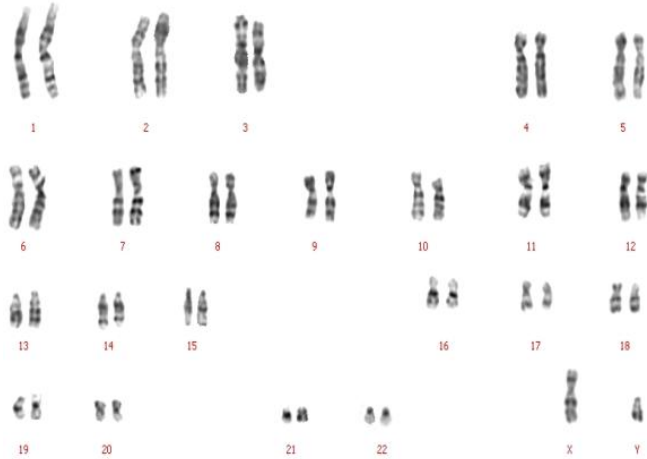


Figura 6.4. Cariotip: 46,XY,del(10p)

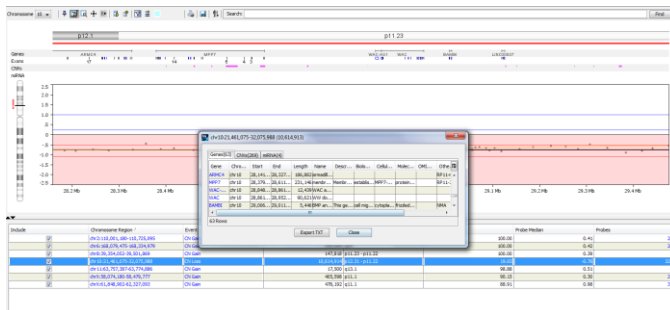


Figura 6.9. Rezultatul evaluării cromozomului 10 prin array CGH
arr 10p12.32p11.22(21,461,075-32,075,988)x1dn

Al doilea caz investigat a fost un pacient cu sindrom Klippel-Trenaunay-Weber și retard mental, evaluat postnatal. Cariotiparea convențională a evidențiat cariotip normal – 46,XY, iar investigația array CGH a identificat o deleție submicroscopică la nivelul brațului lung al cromozomului 2.

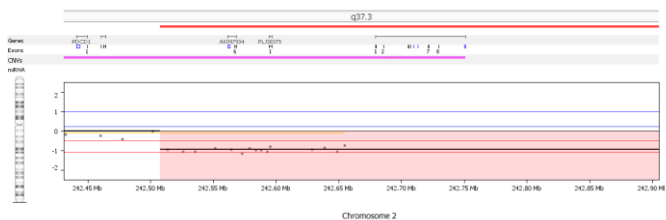


Figura 6.16. Rezultatul evaluării cromozomului 2 prin array CGH

Trei dintre cazurile evaluate prin array CGH au prezentat aneuploidii frecvente: trisomia 21, trisomia 18 și momosomia X.

La cazul cu trisomie 18, s-a efectuat și investigarea părinților prin metoda citogenetică clasică. Aceasta a identificat o translocăție echilibrată la tată între cromozomii 8 și 10.



Figura 6.24. Cariotip: 46,XY,t(8;10)(q22;q26)

Un alt caz investigat prenatal prin array CGH a fost cel al unei sarcini la care evaluarea ecografică a detectat prezența unui defect de tub neural.

Array CGH a evidențiat, printre altele, prezența unei microdeleții la nivelul comozomului 13, ce include gena GPC5 (Glypican 5). Expresia GPC5 a fost identificată la nivelul cartilajului fibros. Studiile efectuate pe culturi celulare au demonstrat importanța GPC5 în calea de semnalizare Hedgehog (Hh), sugerând implicarea acesteia în procesul de dezvoltare a scheletului și membrilor.

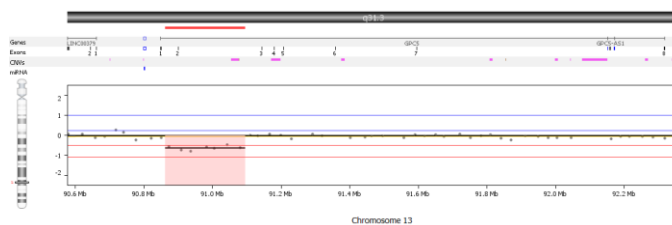


Figura 6.36. Rezultatul evaluării cromozomului 13 prin array CGH

În ceea ce privește celelalte cazuri evaluate prin array CGH, la trei dintre acestea analiza genetică a fost negativă, iar în alte 12 cazuri au fost descrise microdeleții sau microduplicații, care nu au implicare dovedită până la momentul actual în dezvoltarea embrionară.

La un alt caz evaluat s-a identificat monosomia X prin analiza citogenetică clasică, dar investigația array CGH nu a evidențiat această modificare. O posibilă explicație ar fi contaminarea probei analizate cu ADN matern, neputând preciza exact apartenența probei.

Ultimul caz analizat a fost cel al unui cuplu fără copii, cu trei sarcini consecutive cu trisomii autozomale (trisomia 21, trisomia 9 și trisomia 18). Sarcinile au fost evaluate prin cariotipare convențională.

Capitolul 7. Concluzii finale

1. În lucrarea de față, metoda array CGH a condus la identificarea unor modificări genetice la un număr semnificativ de cazuri din cele investigate.

2. Utilizarea array CGH la cazul cu deleția interstițială a brațului scurt al cromozomului 10, identificată prin cariotiparea convențională, a permis evidențierea mărimii fragmentului deletat și conținutul genic al acestuia.

3. Rezultatele noastre susțin rapoartele deja existente în literatură conform cărora array CGH reprezintă o testare foarte utilă în diagnosticul genetic pre- și postnatal.

4. Cariotiparea convențională rămâne în continuare un instrument extrem de util în diagnosticul pre- și postnatal al aneuploidiilor și al anomaliilor de structură, echilibrate și neechilibrate.

5. Analiza array CGH reprezintă o opțiune de diagnostic importantă în cazurile prenatale cu modificări identificate ecografic și cariotip normal, sau atunci când analiza de cariotip nu poate fi efectuată.

6. Testarea array CGH nu poate depista toate patologiiile genetice, această limitare fiind dată de imposibilitatea detectării anomaliilor genetice echilibrate, dar și de rezoluția lamei microarray utilizată pentru efectuarea testării.

7. Datorită posibilității de identificare a microduplicațiilor și microdelețiilor la pacienți care prezintă un tablou clinic complex și polimorf, array CGH constituie un instrument puternic în diagnosticul pre- și postnatal.

8. Analiza suplimentară folosind array CGH permite stabilirea punctelor de ruptură distale și proximale, definirea dimensiunii genomice și conținutul genic al microdeleției sau microduplicației.

9. Analiza array CGH poate să nu identifice nicio modificare a materialului genic la unele cazuri cu anomalii detectate ecografic, dar acest fapt nu exclude existența unui substrat genetic al acelor modificări.

10. Aplicarea la scară largă a testării pre- și postnatale prin array CGH a îmbunătățit capacitatea de detecție a dezechilibrelor genomice responsabile de apariția manifestărilor clinice, permițând astfel oferirea unui diagnostic corect și complet, precum și managementul adecvat al individului afectat și al familiei acestuia.

Bibliografie selectivă

Adams MC, Berg JS, Pearlman MD, Vora NL. Look before you leap: genomic screening in obstetrics and gynecology. *Obstetrics and Gynecology*. 2015;125(6):1299-305.

Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, Hoang S, Docherty Z, et al. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics*. 2010;3:9.

Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 2015.

Binns V, Hsu N. *Prenatal Diagnosis*. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.

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? *Prenatal Diagnosis*. 2011;31(3):235-43.

Callaway JL, Shaffer LG, Chitty LS, Rosenfeld JA, Crolla JA. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenatal Diagnosis*. 2013;33(12):1119-23.

Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, 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. *Molecular Cytogenetics*. 2010;3:24.

Evans MI, Andriole S, Evans SM. Genetics: Update on Prenatal Screening and Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2015;42(2):193-208.

Gardner RJMK, Sutherland GR, Shaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*: Oxford University Press, USA; 2011.

Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology : the official*

journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2013;41(6):610-20.

Kannu P, Campos-Xavier AB, Hull D, Martinet D, Ballhausen D, Bonafe L. Post-axial polydactyly type A2, overgrowth and autistic traits associated with a chromosome 13q31.3 microduplication encompassing miR-17-92 and GPC5. *European Journal of Medical Genetics*. 2013;56(8):452-7.

Mroczkowski HJ, Arnold G, Schneck FX, Rajkovic A, Yatsenko SA. Interstitial 10p11.23-p12.1 microdeletions associated with developmental delay, craniofacial abnormalities, and cryptorchidism. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014;164a(10):2623-6.

Ogilvie CM, Yaron Y, Beaudet AL. Current controversies in prenatal diagnosis 3: For prenatal diagnosis, should we offer less or more than metaphase karyotyping? *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(1):11-4.

Puiu I, Stoica A, Sosoi S, Puiu A, Ioana M, Burada F. Terminal deletion 2q37.3 in a patient with Klippel-Trenaunay-Weber syndrome. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2013;32(5):351-6.

Sosoi S, Streata I, Tudorache S, Burada F, Siminel M, Cernea N, et al. Prenatal and postnatal findings in a 10.6 Mb interstitial deletion at 10p11.22-p12.31. *Journal of Human Genetics*. 2015;60(4):183-5.

Sparkes R, Johnson JA, Langlois S, Wilson RD, Allen V, Blight C, et al. New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2008;30(7):617-21, 22-7.

Stergiotou I, Borobio V, Bennasar M, Gonce A, Mula R, Nuruddin M, et al. Transcervical chorionic villus sampling: a practical guide. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2015:1-8.

Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, et al. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Human Mutation*. 2012;33(6):923-9.

CURRICULUM VITAE

Nume și prenume: Șerban-Șoșoi Simona-Veronica

Data și locul nașterii: 13.07.1984, Craiova, Dolj

Cetățenia: Română

E-mail: simona.sosoi@geneticamedicala.ro

Studii:

- 1999-2003, Colegiul Național “Elena Cuza”, Craiova
- 2003-2009, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Activitate profesională:

- 01.2010 - 12.2014, medic rezident Genetică Medicală – Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca
- 01.2015 – prezent, medic specialist Genetică Medicală
- 01.2015 – prezent, medic rezident Medicină de Laborator – Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova

Activitate didactică și științifică:

- 10.2010 – 06.2011, cadru didactic asociat, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca
- 10.2011 – prezent, Doctorand la Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova, Domeniu Medicină, Biologie Celulară și Moleculară
- 04.2013 – prezent, asistent de cercetare, membru al echipei de cercetare din cadrul proiectului FP7 – TANDEM (Concurrent Tuberculosis and Diabetes Mellitus; unravelling the causal link, and improving care)
- 10.2014 – prezent, membru al echipei de cercetare din cadrul proiectului “Studiul anomaliilor cromozomiale de structură în sarcinile cu risc obstetrical crescut”

Membru al asociațiilor profesionale:

- Societatea Europeană de Genetică Umană (ESHG)
- Societatea Română de Genetică Medicală (SRGM)
- Societatea Română de Biologie Celulară (SRBC)

Publicații din teză:

1. A rare occurrence of three consecutive autosomal trisomic pregnancies in a couple without offspring. F. Burada, S. Sosoi, D. Iliescu, M. Ioana, D. Cernea, S. Tudorache. Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology – in press
2. Prenatal and postnatal findings in a 10.6Mb interstitial deletion at 10p11.22-p12.31. Sosoi S, Streata I, Tudorache S, Burada F, Siminel M, Cernea N, Ioana M, Iliescu DG, Mixich F. J Hum Genet. 2015 Apr; 60(4):183-5.
3. Terminal deletion 2q37.3 in a patient with Klippel-Trenaunay-Weber syndrome. Puiu I, Stoica A, Sosoi S, Puiu A, Ioana M, Burada F. Fetal Pediatr Pathol. 2013 Oct; 32(5):351-6.