

Primer Congreso Argentino de Neonatología-
Primera Jornada Nacional de Perinatología
Sociedad Argentina de Pediatría

Genética y epigenética
Defectos congénitos



Dr. Enrique Gadow
Unidad de Genética. CEMIC
2 de octubre de 2010





Evolución en el conocimiento del Genoma Humano

1953: J. Watson, F Crick. Estructura del ADN

1972: P Berg Molecula Recombinante de ADN

1980: D. Boetyein Mapeo genómico por RFLP

1985: Factibilidad de establecer la secuencia del genoma

1988: NIH - DOE: Reunión. J. Watson Coordinador. HUGO

**1992: J. Craig Venter crea el Institute Genomic
Recombination**

D Page logra secueenciar al cromosoma Y

D Cohen el cromosoma 21

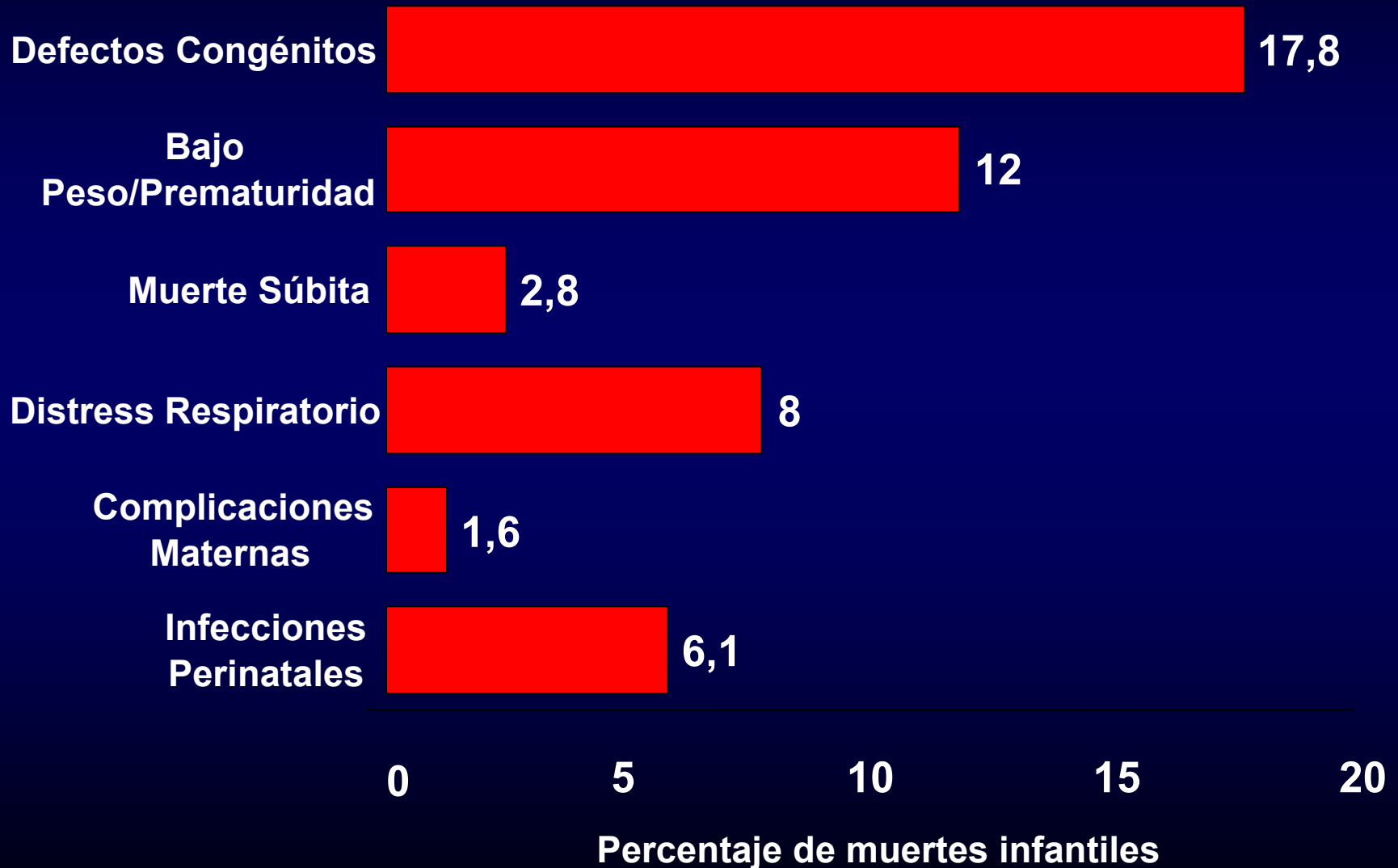


Dr. Fritz Fuchs

**Primer DX prenatal de sexo
Enfermedades ligadas al X (1956)**



Principales causas de Mortalidad Infantil en Argentina



Evolución histórica del Diagnóstico Genético

- | | | |
|------|--|----------------|
| 1951 | Amniocentesis y biopsia de placenta | H. Alvarez |
| 1956 | Diagnóstico prenatal de sexo (Enf lig X) | F. Fuchs |
| 1965 | Estudio citogenético en células de L.A. | Carlo Valenti |
| 1967 | Diagnóstico preimplantación blastocistos conejas | Edwards |
| 1976 | Estudio citogenético en vellosidades coriales | Simoni |
| 1976 | FISH cromosoma Y | Ferguson Smith |

Evolución histórica del Diagnóstico Genético

1978	1er nacimiento fertilización in Vitro	Step toe, Edwards
1985	PCR	Premio Nobel K Mullis
1989	Diagnóstico preimplantación Enf ligada al X	Handyside
1993	FISH multicolor. Diagnóstico preimplantación	Munne
1995	HUGO // ELSI	NIH
1999	Multiple round FISH. Diagnóstico preimplantación	Gianaroli
2000	FISH para translocaciones	Munne
2001	Células fetales en circulación materna	NIFTY
2002	ADN y ARN fetal en suero materno	Dennis Lo, Bishoff FZ
2004	Secuencia de ADN con “microarrays” en una célula.	D. Wells

Proyecto Genoma Humano

Impacto en la medicina

- **Mejora nuestra comprensión y categorización de las enfermedades**
- **El tratamiento con drogas será más seguro y efectivo porque toma en cuenta la respuesta individual**
- **Crecerá el uso de estudios genéticos para predecir el riesgo de enfermedad e iniciar intervenciones preventivas.**
- **Desarrollo biotecnológico. Nuevas “herramientas” diagnósticas y terapéuticas.**

El feto como paciente

Del genotipo a

la imagen



PCR Convencional

Amplificación

- Áreas separadas
- Prep. de Master Mix
- Tubos individuales
- (Mineral Oil)
- Diferentes Cc en Rvos
- Variación en tiempos de ciclado y temp.

Detección

- Áreas separadas
- Marcar la sonda
- Hibridación
- Preparación de geles
- Electroforesis
- Autorradiografía
- Interpretación

Beneficios del Real Time

- Resultado rápido
- Impacto clínico en el manejo del paciente
- Sensibilidad, especificidad similar a PCR
- Estandarización, reproducibilidad
- Fácil de monitorear (QC)
- Cuantificación
- Menor riesgo de contaminación

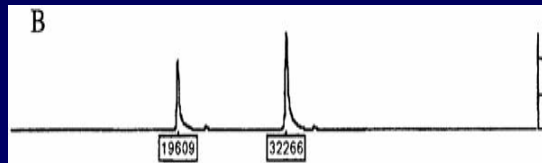
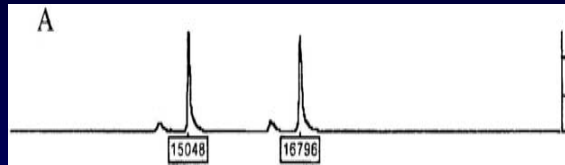
La aplicación del Real time en lab. Cínicos es inminente

Detección y cuantificación de microorganismos, mutaciones genéticas, polimorfismos, expresión de genes.

**DIAGNOSTICO, PATOGENESIS,
INMUNIDAD, RESISTENCIA
A DROGAS**

Futuro del Diagnóstico Prenatal

PCR Fluorescencia Cualitativa (QF-PCR)



	Tiempo (días)	Tiempo operador (horas)	Costo
Cariotipo convencional	7-10	7-10	+++
FISH en metafase	8-11	8-11	++++
FISH en interfase	1-2	1-2	+++
QF-PCR	1	1	¿+?

Medicina embriofetal

Futuro

Del genotipo al fenotipo

- Diagnóstico preimplantación
- Células fetales en circulación materna
- Genes candidatos



“Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) has evolved from a strictly narrow genetic focus to broader, novel, indications not initially envisioned by the genetic community.”

Joe Leigh Simpson, M.D.

Prof. Departments of Obstetrics & Gynecology and Molecular and Human Genetics

Medicina perinatal

Futuro

Del genotipo al fenotipo

- Diagnóstico preimplantación
- Células fetales en circulación materna
- Genes candidatos

Diagnóstico Preimplantación

- Técnica disponible desde 1990 (Handyside)
- 1991: International Working Group on PGD.
- 1997: ESHRE PGD Consortium.
- 2000: Incorporado a la ISPD.

Anomalías cromosómicas en ovocitos y embriones

	Ovocitos	Embriones
Aneuploidías aisladas	1:6735 (29%)	1:4000 (23%)
Aneuploidías complejas	23%	37%
Totales	52%	60%

1st POLAR BODY



2nd POLAR BODY

13 16 18 21 22

Diagnóstico Preimplantación (PGD) Biopsia del 1º cuerpo polar

Ventajas



Mantiene la integridad del embarazo

Desventajas



No permite detectar anomalías de origen paterno

Aceptabilidad del PGD

Iguals indicaciones que el diagnóstico prenatal tradicional.

Evita procedimientos invasivos posteriores.

Evitar el aborto inducido en embarazos “clínicos”

Conclusiones

Tal como ocurrió con el diagnóstico prenatal en la década del 80, en la presente década habrá una mayor demanda por parte de las parejas para el diagnóstico preimplantación.

Debe contemplarse tanto la autonomía de la paciente como la objeción de conciencia.



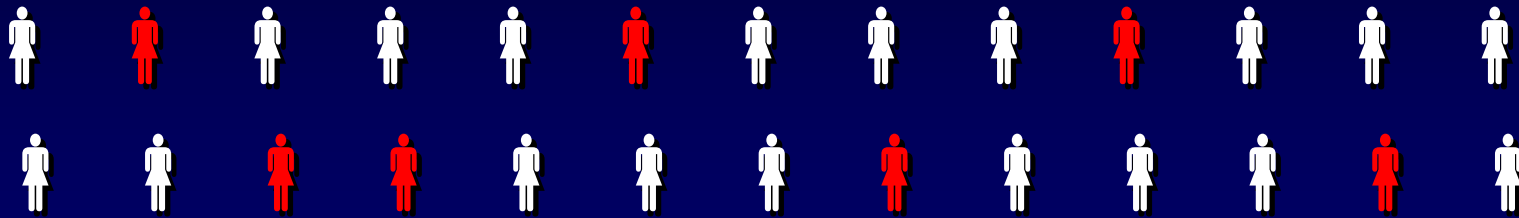
Diana Bianchi

International Society for Prenatal Diagnosis, ISPD
Secretary

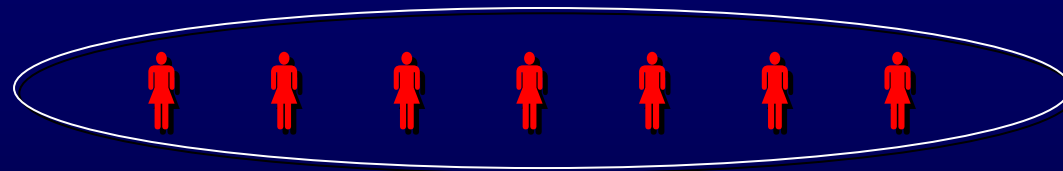


“Screening” o Tamizaje preconcepcional

PREGUNTA O PRUEBA



Grupo de Riesgo



ESTUDIO DIAGNÓSTICO



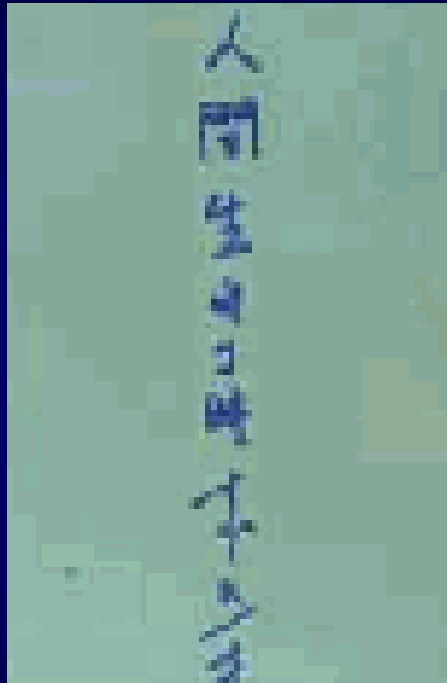
AFFECTADOS



Células fetales en la circulación materna

NIFTY - Estudio colaborativo NIH

- Sensibilidad comparable con método de “screening” único
- Especificidad superior a métodos de “screening” no invasivos
- Mejorando la recuperación de células fetales -anticuerpos específicos- mejorará la sensibilidad



“El niño al nacer tiene un año de vida”

Proverbio oriental.

“El momento más vulnerable de nuestras vidas
no es al nacer como se creía, sino en los primeros
estadios de la gestación”

Medicina embriofetal

Futuro

Del genotipo al fenotipo

- Diagnóstico preimplantación
- Células fetales en circulación materna
- Genes candidatos

Genoma Humano

Genes candidatos

Definición:

Genes que se encuentran con mayor frecuencia en afectados que en la población general.

Control:

Madre del afectado.

Genoma Humano

Genes candidatos

- Identificación de poblaciones en riesgo
- Susceptibilidad genética

Genoma Humano

Genes candidatos

Metodología del estudio:

- Desequilibrio de ligamiento
- Test de asociación
- Presencia en otras especies
- Transferencia génica

Genoma humano

Genes candidatos

Ejemplos:

Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)  ACTN

Factor alfa de crecimiento (TGF α)  Labio leporino

Sonic hedgehog (SHH)  Holoprosencefalia

.....  Prematurez ??

Las técnicas diagnósticas permiten aclarar mecanismos etiopatogénicos e implementar estrategias de prevención.

**EN EL PASADO COMPLETAR ESTA SECUENCIA
LLEVABA DECADAS, HOY, PARA BIEN DE LA
HUMANIDAD, LOS TIEMPOS SE HAN ACORTADO**

STEM CELL RESEARCH



George W. Bush



Stem cell / célula madre

Célula que deriva de un embrión , feto o adulto y que bajo ciertas condiciones tiene la capacidad de reproducirse por largos períodos y además puede dar origen a células especializadas.

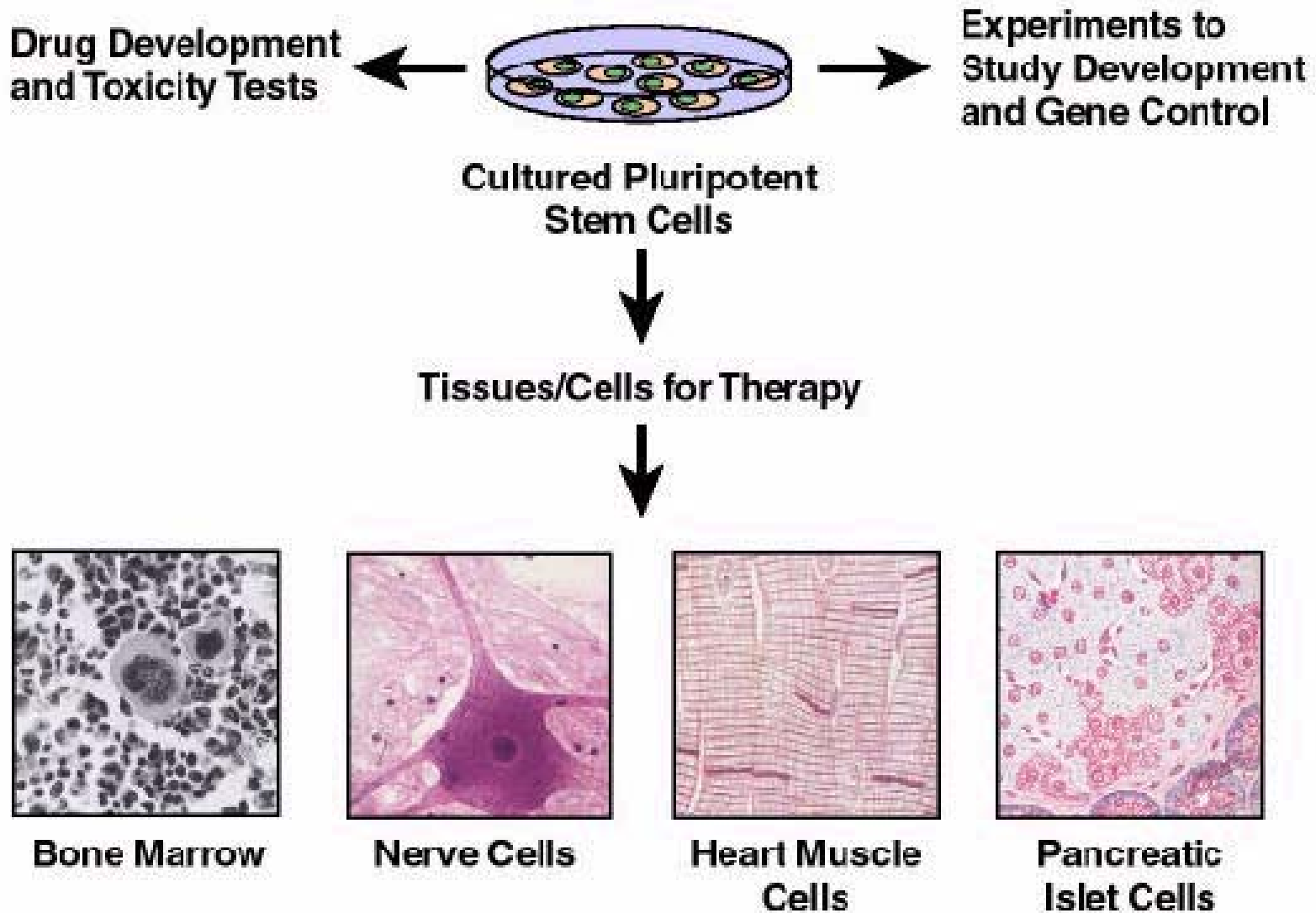
Potencialidades de las Stem cell

Stem cell embrionaria → Totipotente

Stem cell embrionaria → Pluripotente
(Maciso interno del blastocisto)

Stem cell adulto → Multipotente

The Promise of Stem Cell Research



Diagnóstico prenatal Dilemas Futuros

Enfermedades prevalentes en el adulto
podrán ser identificadas prenatalmente.

¿Cuál es el límite?

“El gran peligro de la humanidad no es el desarrollo del saber. Es la ignorancia.”

“Con decir la verdad no basta. Es preciso además decir toda la verdad.”

Francois Jacob. Premio Nobel de Medicina, 1965.

EPIGENÉTICA

EPIGENÉTICA

- **Epigenética**: cambios heredables en la expresión génica que no van acompañados de cambios en la secuencia de DNA
- Modificación por el entorno: edad, dieta, tabaco...

Mecanismos Epigenéticos

- Metilación del ADN
- **Modificación de Histonas**
 - Metilación
 - Acetilación
 - Fosforilación
 - Ubiquitinación
- Imprinting
- Epigenética y Anomalías Congénitas

ROLES DE LA EPIGENÉTICA

- La epigenética participa en:
 - Desarrollo embrionario
 - Diferenciación tisular
 - “Imprinting” génico
 - Inactivación del cromosoma X
 - Represión de DNA parásito (transposones)
 - Papel menor en la regulación génica (islas CpG normalmente no metiladas), pero importante en patología

¿Qué es “imprinting”?

Expresión bi-alélica

Expresión de ambos genes heredados, de origen materno y paterno

Imprinting genómico

Expresión desigual de los alelos de un gen materno o paterno

Los defectos de imprinting y la disomía uniparental representan fenotipos de enfermedades epigenéticas

Imprinting Genómico

Es una modificación epigenética de un cromosoma parental específico en la gameta o cigota que lleva a una expresión diferencial de dos alelos de un gen en una célula somática del hijo dependiendo de cual padre derive.

Anomalías Congénitas : **Imprinting**

RESUMIENDO...

- *Imprinting* és un fenómeno epigenético normal.
 - *Relacionado a la metilación del ADN y modificación de la cromatina*
 - *No hay alteración de la secuencia de ADN*

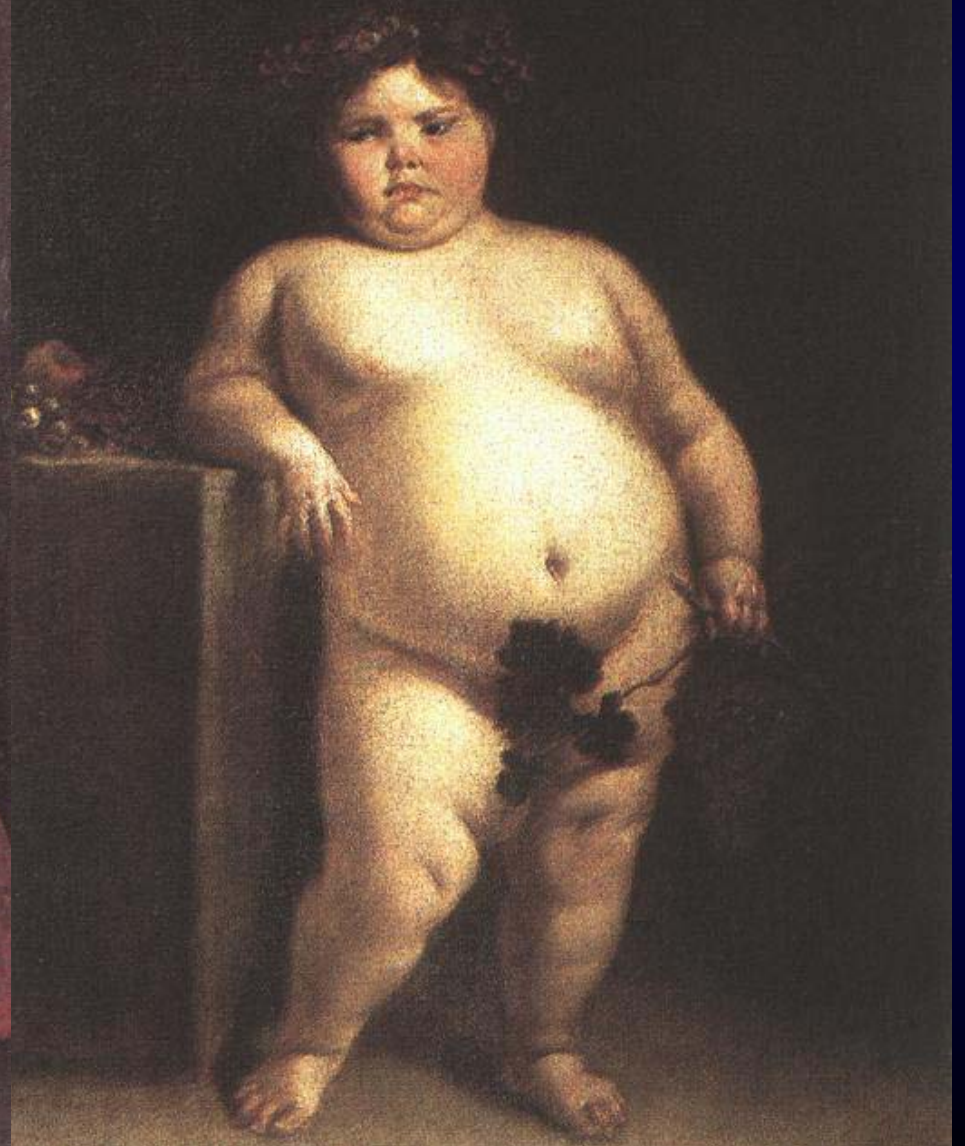
Síndrome de Prader-
Willi

y

Síndrome de Angelman

Eugenia Martinez Valleji, llamada La Monstrua

Juan Carreño de Miranda 1614-1685



¿Qué tienen en común?



AS



PW

Anomalías Congénitas : Imprinting

RESUMIENDO...

- Síndrome de Prader-Willi (PWS) 15q11-q13 (OMIM 176270)
 - Normal:
 - *Imprinting* materno
 - Anomalía:
 - Deleción del cromosoma paterno
 - Prader-Willi → Paterno

Anomalías Congénitas : Imprinting

RESUMIENDO...

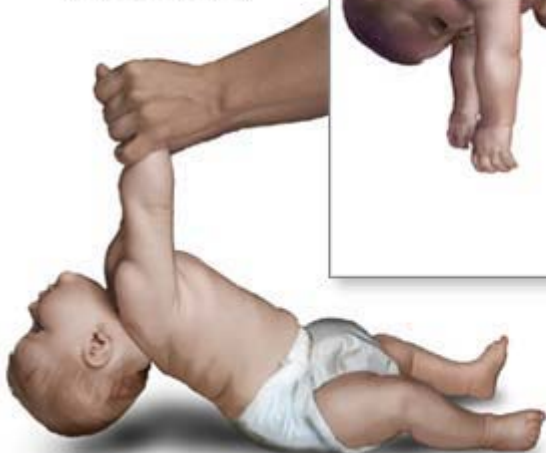
- Síndrome de Angelman (AS) 15q11-q13 (OMIM 105830)
 - Normal:
 - *Imprinting* paterno
 - Anomalía:
 - Deleción del cromosoma materno
 - Angelman → Materno

PW- Características Clínicas- Nacimiento



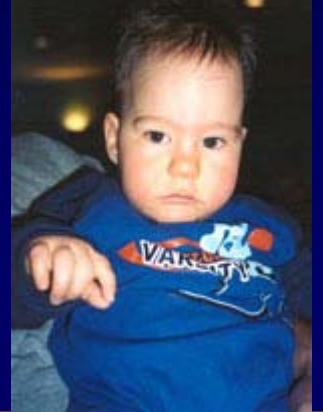
- ✓ Hipotonía sin dificultad respiratoria
- ✓ Problemas en la succión.
- ✓ Quistes encía
- ✓ Saliva viscosa
- ✓ Hipoplasia genital

Hypotonia
(decreased
muscle tone)



- ✓ Presentación
pelviana
- ✓ Cesárea
- ✓ Polihidramnio

PW-Characterísticas Clínicas



Narrow temple distance
and nasal bridge

Almond-shaped eyes
Mild strabismus

Thin upper lip
Downturned mouth

Overweight



PW- Seguimiento

Frecuencia 1/10.000 a 1/15.000 nacimientos.

**El manejo requiere una aproximación multidisciplinaria.
Combinación de problemas nutricionales, médicos y de comportamiento.**

En general la salud es buena salvo que la obesidad sea severa.

PW- Seguimiento

PERIODO NEONATAL

ALIMENTACION

Presentan importante hipotonía y tienen dificultades para succionar y deglutir por lo que pueden llegar a necesitar alimentación por gavage. A los 6 meses los trastornos en la alimentación suelen mejorar. Debe haber un control pediátrico cercano para monitorizar el aumento de peso.

REGULACIÓN TERMICA

La termorregulación puede estar alterada en este período y algunos niños pueden presentar hipotermia.

CONSULTA GENETICA

CONTENCIÓN DE LOS PADRES

El niños suele estar somnoliento y no tener interés por la comida y tener poco intercambio con los padres.

Próximias Actividades:

Jueves 7 de Setiembre 2006 Reunion en FEI

Ver en Novedades: [Piden difundir....\(Dip. Karina Rocca, Prov. Bs As. nuevo](#)
[1956-2006 , 50 Años después...\(link\)](#)

VI Conf. Internacional SPW , Cluj Rumania Junio 2007

NUEVO: AMPARO EN CIUDAD BUENOS AIRES ASISTENTE PERSONAL Y EXCLUSIVO EN CLASES..(LINK AL FALLO)



PRADER - QUÉ ??

La página de la

Asociación Civil para Síndrome de Prader-Willi (Argentina)

ÍNDICE

Resumen del Síndrome de Prader-Willi

Algunos consejos para la Convivencia

Guías para el manejo del Síndrome

Algunos datos para los educadores y escuelas

Notas Importantes para los Médicos tratantes

Hermanos y familia

Otros Links de interés ■

Novedades

Reuniones y Congresos ■

Comentarios y Contacto *:

TELÉFONO: 011 - 155 - 376-9541

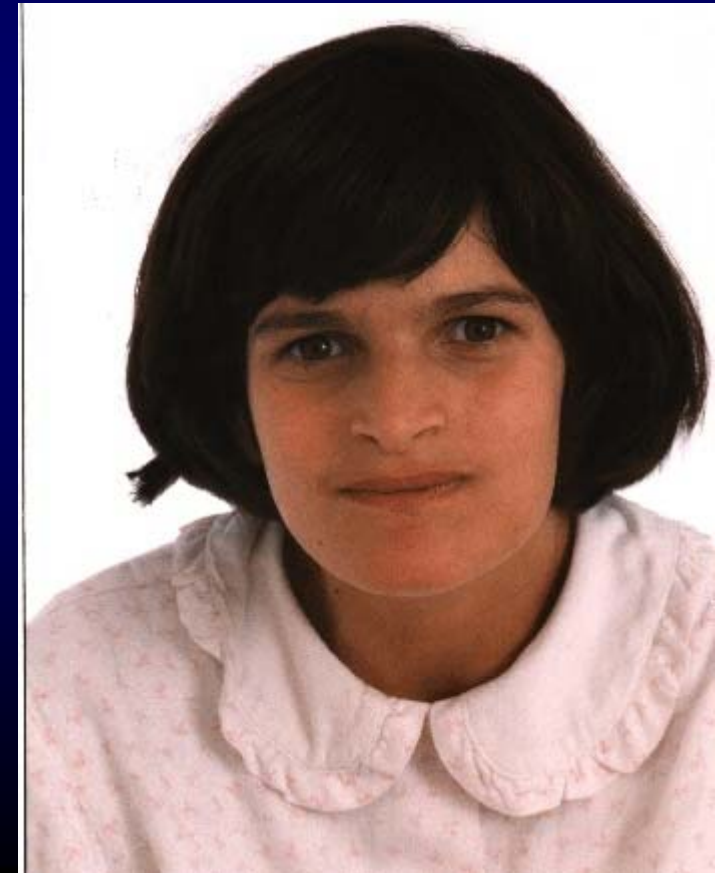
desde el exterior de Argentina :

(54 911)-5376-9541

<http://www.praderwilliarg.com.ar>



Sindrome de Angelman



Síndrome de Angelman

Más del **80%** de los pacientes presentan

- Retraso o crecimiento lento del perímetro cefálico, llevando a la microcefalia a los 2 años
- Convulsiones, generalmente comenzando antes de los 3 años
- EEG anormal, con patrón característico de onda de alta amplitud y picos lentos

Síndrome de Angelman

Menos del 80% de los pacientes presentan

Braquicefalia

Estrabismo

Hipopigmentación de piel y ojos

Lengua prominente, trastornos de la succión y deglución, babeo, masticación excesiva

Problemas de alimentación en la lactancia

Boca grande, dientes espaciados, mandíbula prominente

Reflejos tendinosos hiperreactivos

Brazos flexionados al caminar

Aumento sensibilidad al calor

Trastornos del sueño

Atracción al agua.





A.P.S.A. - Argentina
Asociación de Padres de
Síndrome de Angelman

FORO /
melodysoft.com

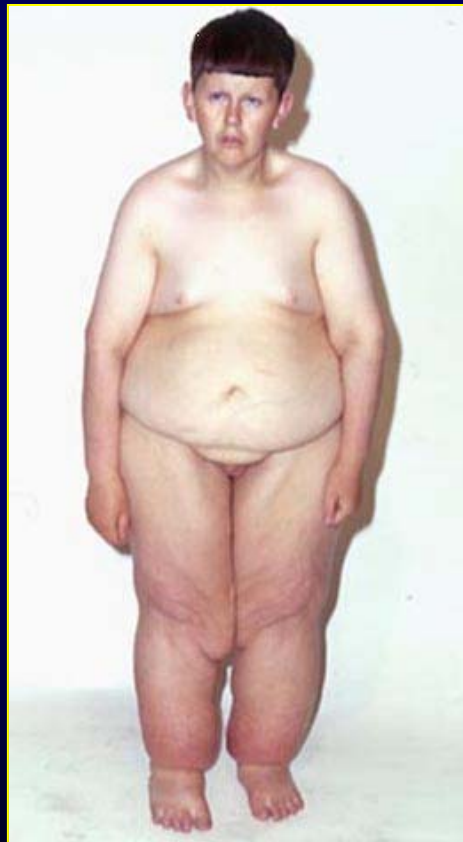
FOTOS

▶ TARJETAS DE NAVIDAD

<http://www.sindromedeangelman.org.a>

Síndrome de Prader-Willi o Síndrome de Angelman

¿Qué tienen en común?

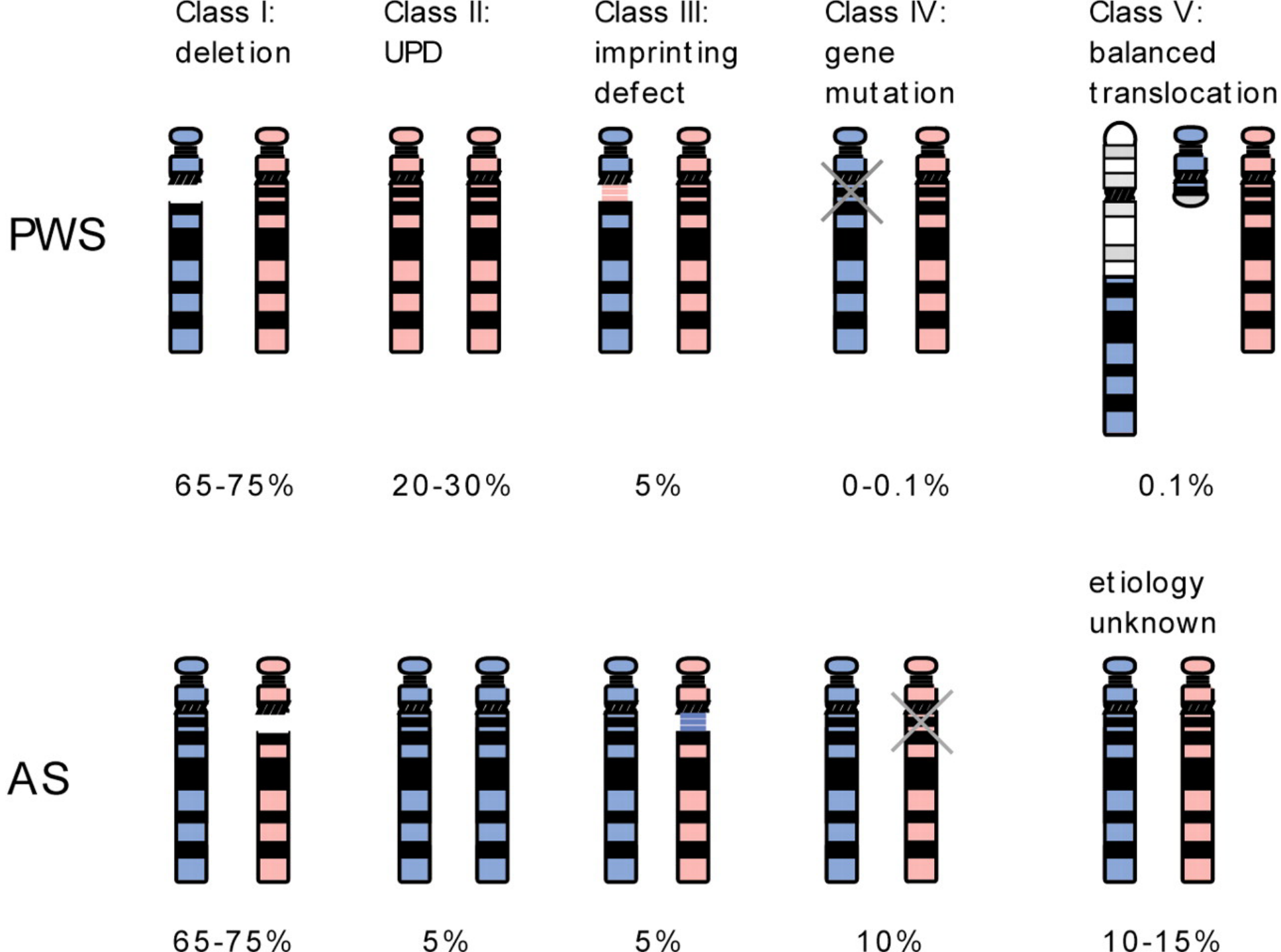


PW



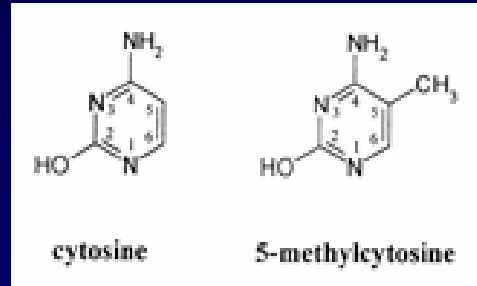
AS

- Usualmente causados por una deleción **15q11-q13**
- Deleción del cromosoma materno = AS
- Deleción del cromosoma paterno = PWS



Las modificaciones epigenéticas ocurren por

- **Metilación ADN:** metilación de citosina en posición C5 en los dinucleótidos CpG

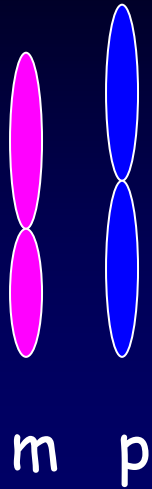


- **Modificaciones de Histonas:** alterando la estructura y remodelación de la cromatina.
- **Factores asociados o modificadores de la cromatina:** como factores de transcripción y otros..

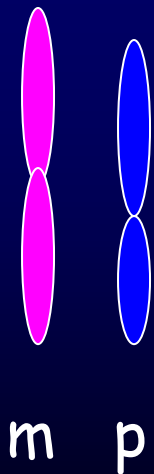
El mecanismo de metilación del ADN es el mejor conocido.

Imprinting Genómico

- ✓ Los genes se expresan diferencialmente dependiendo de cual padre deriven
- ✓ Los genes imprintados son genes cuya expresión esta determinada por el padre que contribuyó con el mismo.
- ✓ Los genes imprintados violan la regla común de heredabilidad donde ambos alelos en un heterocigoto estan igualmente representados: en mamíferos se ha encontrado un pequeño número de genes (~ 50) imprintados.



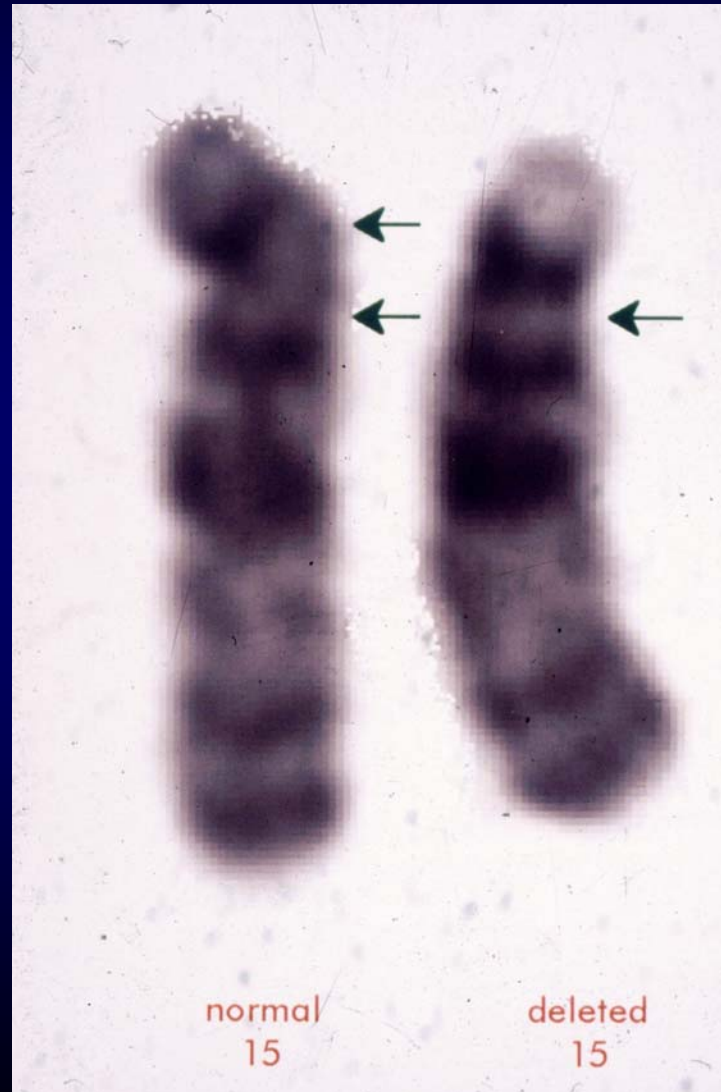
En el síndrome de ANGELMAN la delección se encuentra en el cromosoma heredado de la MADRE



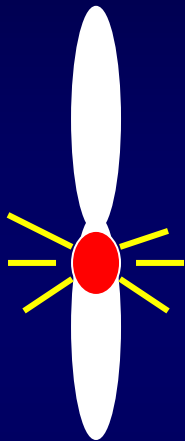
En el síndrome de PRADER-WILLI la delección se encuentra en el cromosoma heredado del PADRE

Casi todas las deleciones son “de novo”

Deleción 15q11-13



Principios de la técnica de FISH



Cromosoma 15 Normal. La sonda se “pega” a 15q11-13 y fluoresce



Cromosoma 15 delecionado. La sonda no se pega
No hay señal

Técnica de FISH



Disomía uniparental (UPD)

- Es cuando los dos cromosomas homólogos provienen del mismo padre
- Ocurre por corrección postcigótica de una trisomía, perdiéndose uno de los tres homólogos, o por unión de un gameto disómico con uno nulisómico
- Si se trata de un cromosoma sometido a regulación por impronta el portador de una UPD puede presentar alguno de los síndromes

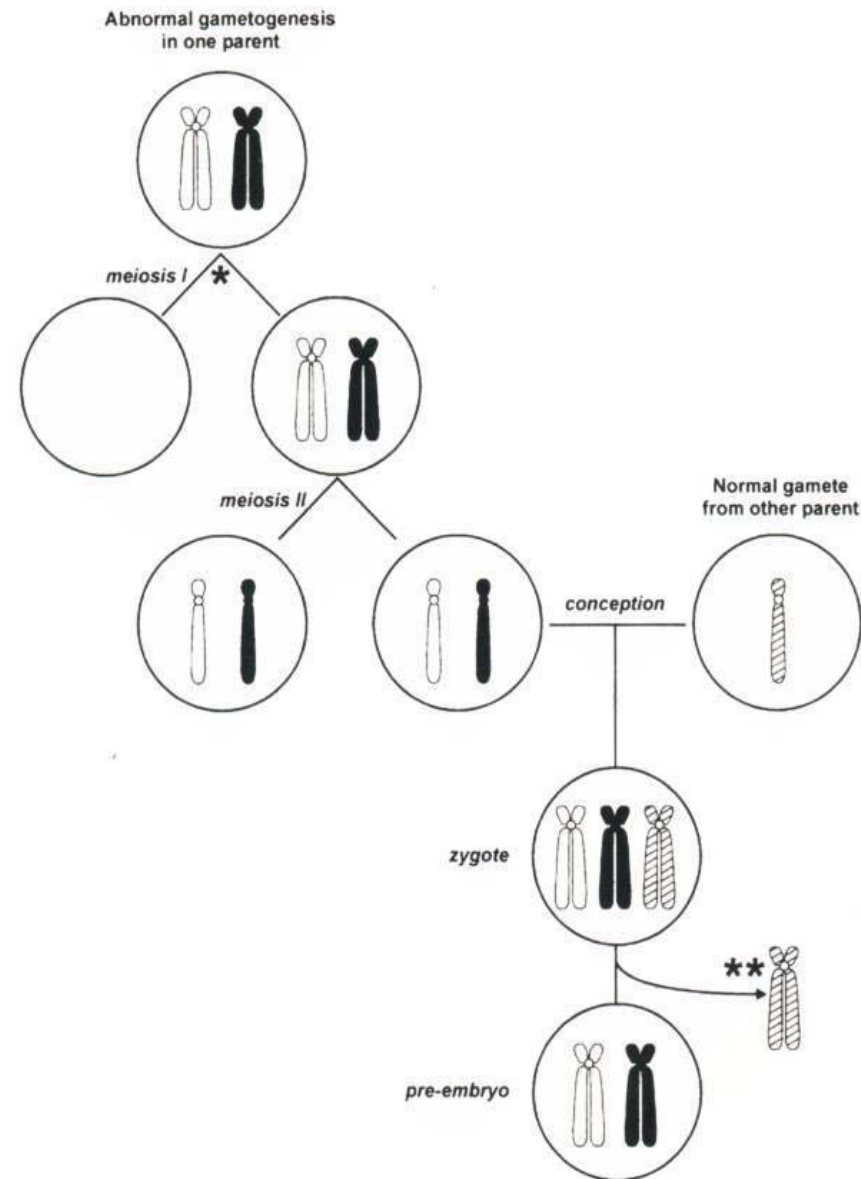


FIGURE 2-9. Uniparental disomy from "correction" of a trisomic conceptus by loss of a homolog. Nondisjunction* at meiosis I, followed by postzygotic loss** of one homolog, causes uniparental heterodisomy. (If, for example, this were chromosome No. 15, and the meiotic nondisjunction occurred in the mother, the child would have Prader-Willi syndrome.) Nondisjunction at meiosis II would cause uniparental isodisomy.

Anomalías Congénitas : Imprinting

Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) 11p15.5 (OMIM 130650)

Síndrome de hipercrecimiento
(overgrowth)

Clásicamente definido por la triada:

- Onfalocele
- Macroglosia
- Macrosomía

Prevalencia 1:15.000

Sotelo-Avila, et al *J of pediatrics*, 96: 47-50, 1980.
Eliot et al, *Clin Genet*, 46, 168-174, 1994.
Shuman et al. *Am J Hum Genet*, 71:A1800-477, 2002.



Anomalías Congénitas : Imprinting

Síndrome de Beckwith-Wiedemann
(BWS) 11p15.5 (OMIM 130650)

Gran variabilidad fenotípica:

Individual

Intrafamiliar



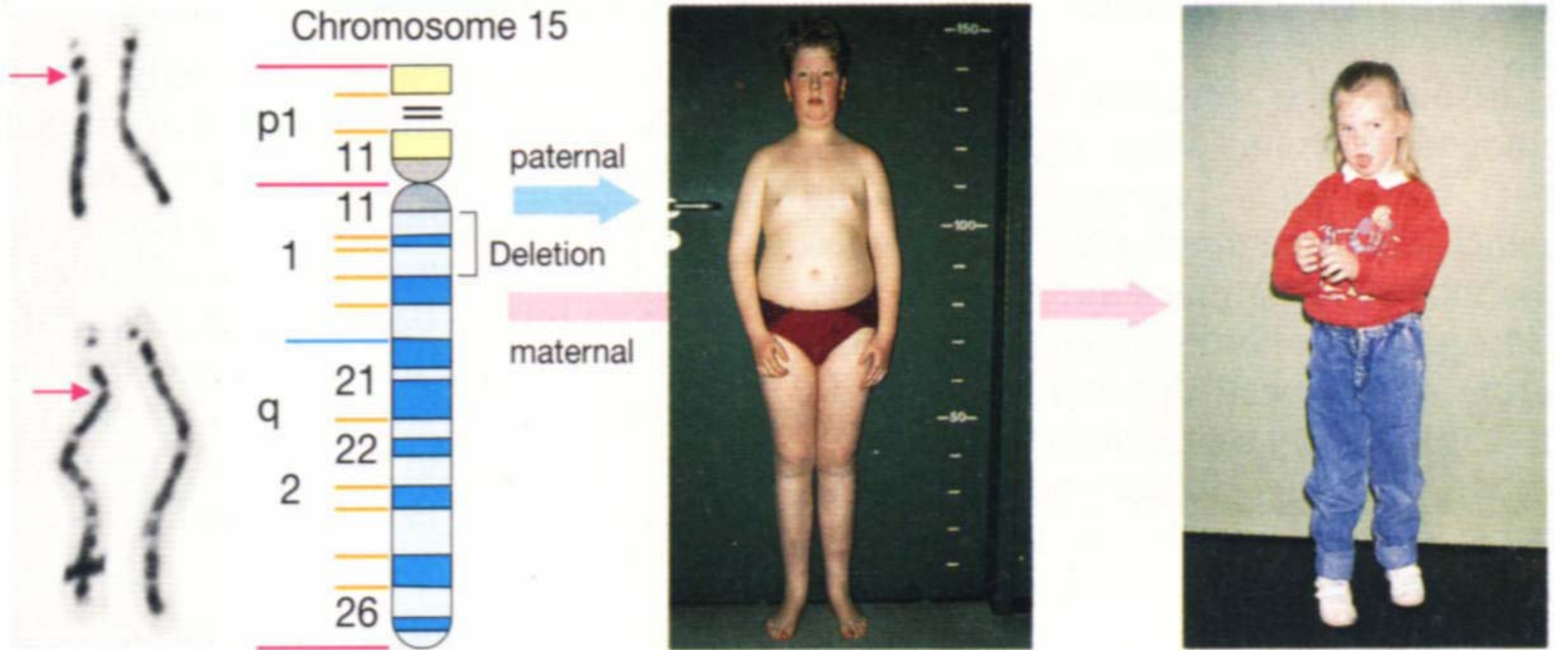
Sotelo-Avila, et al *J of pediatrics*, 96: 47-50, 1980.

Eliot et al, *Clin Genet*, 46, 168-174, 1994.

Shuman et al. *Am J Hum Genet*, 71:A1800-477, 2002.

Prader-Willi: hipotonía neonatal, retraso en el desarrollo, obesidad, corta estatura, manos y pies pequeños, hipogonadismo e hipopigmentación

Angelman: retardo mental, poco desarrollo del lenguaje, amistosos, se ríen sin razón, comportamiento hiperactivo, ataques, cambios en el EEG, e hipopigmentación



1. Interstitial deletion 15q11-13

2. Prader-Willi syndrome

3. Angelman syndrome

A. Two syndromes associated with the same chromosomal region

PRENATAL DIAGNOSIS

Prenat Diagn 2009; **29**: 1020–1030.

Published online 31 July 2009 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/pd.2335

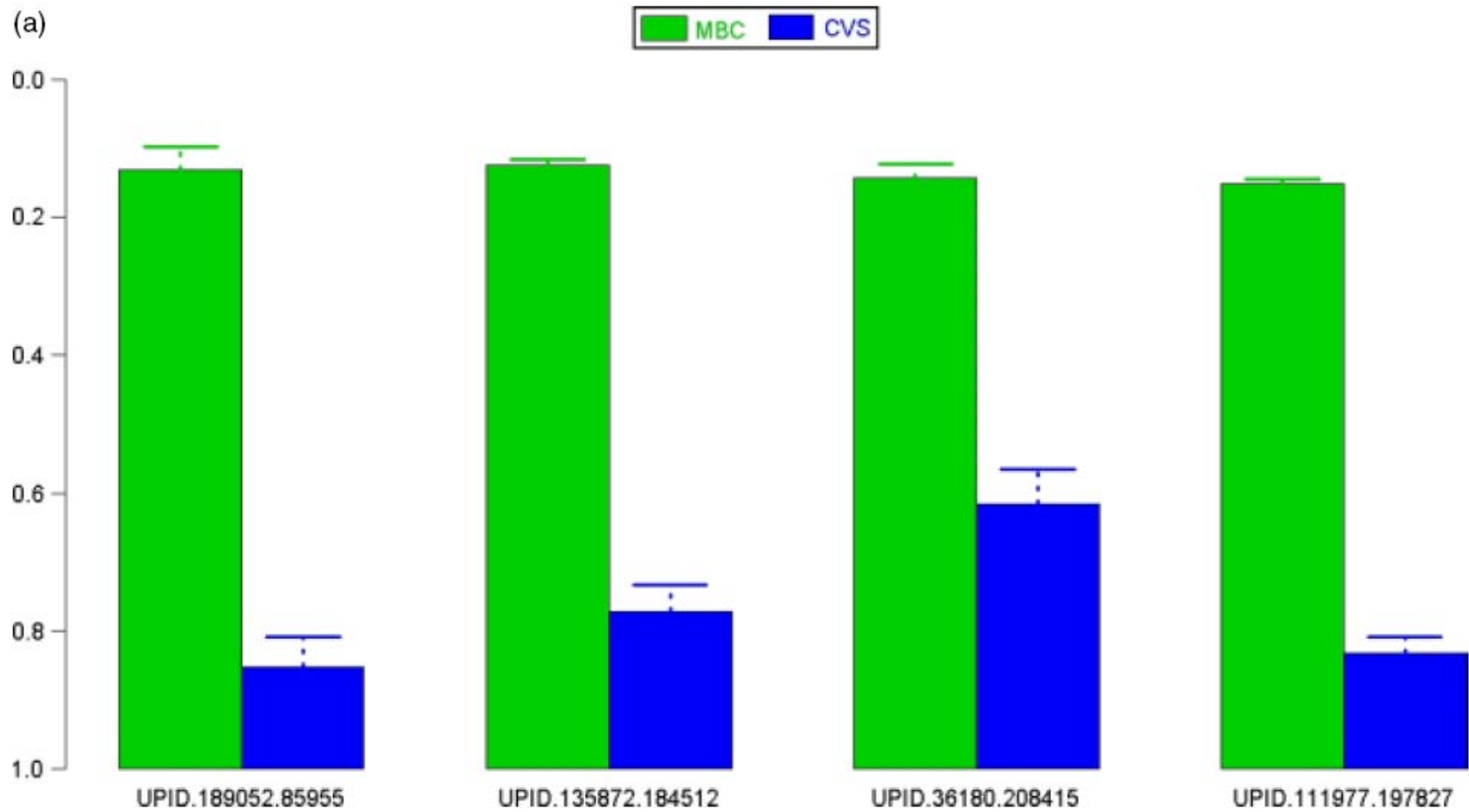
A microarray-based approach for the identification of epigenetic biomarkers for the noninvasive diagnosis of fetal disease

**Tianjiao Chu^{1,2}, Brian Burke^{1,2}, Kimberly Bunce^{1,2}, Urvashi Surti^{1,2}, W. Allen Hogge^{1,2}
and David G. Peters^{1,2*}**

¹*Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, University of Pittsburgh, PA 15213, USA*

²*Centre for Fetal Medicine, Magee-Womens Research Institute, Pittsburgh, PA, USA*

EPIGENETIC BIOMARKER DISCOVERY FOR FETAL ANEUPLOIDY



(b)

Legend: MBC (green), CVS (blue), Control (cyan)

Algoritmo para Métodos Diagnósticos



CONCLUSIONES

- La epigenética se presenta como un arma potencialmente muy útil para diagnóstico, seguimiento y tratamiento de múltiples patologías: cáncer, aterosclerosis, Alzheimer...
- Se precisa aún de numerosos estudios para:
 - Optimizar sus posibles aplicaciones
 - Garantizar su reproducibilidad
 - Aumentar la especificidad
- Planteamiento de la necesidad de un “proyecto epigenoma”



“Yo no quise nacer antes”!

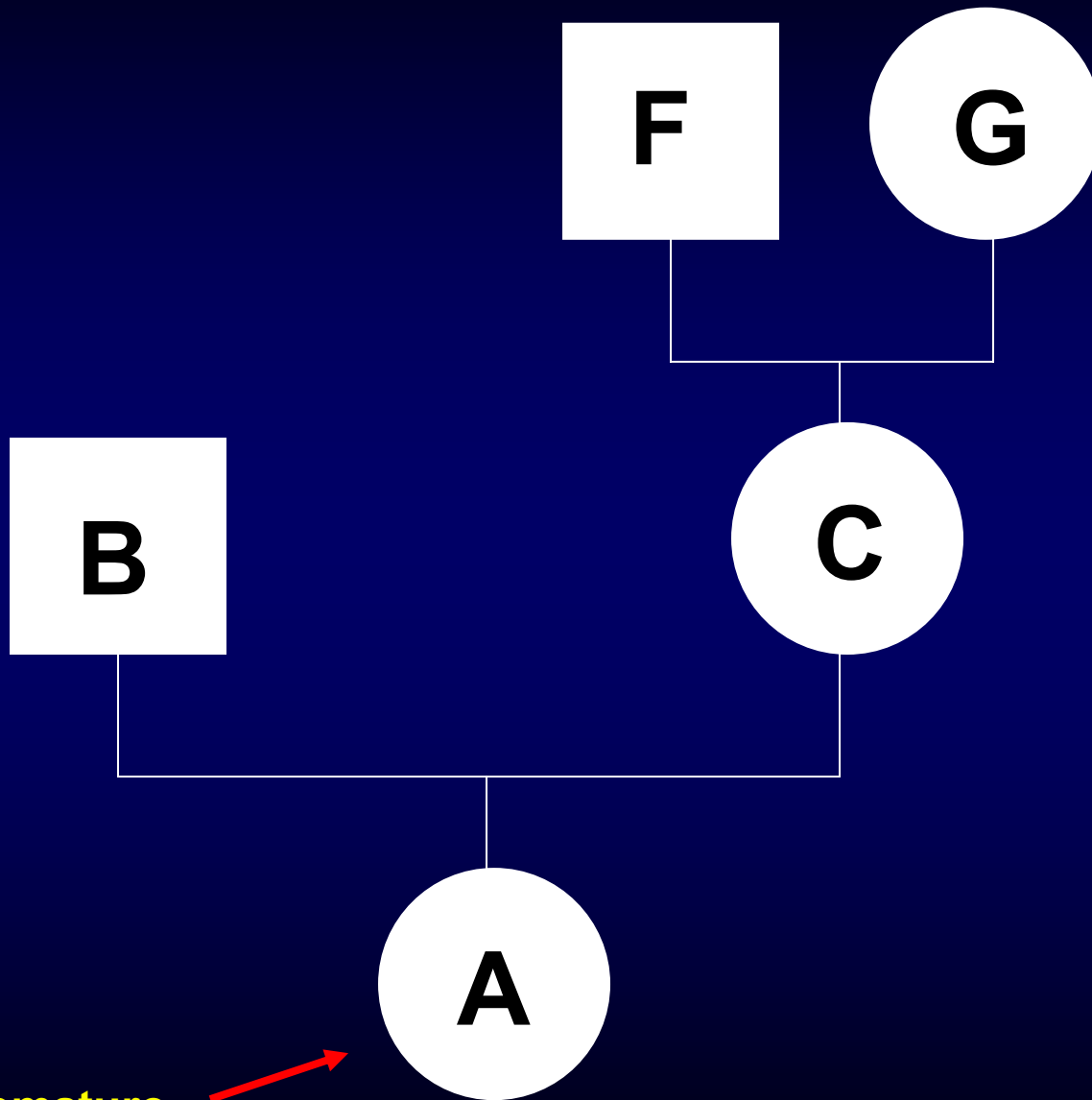
O Ministério da Saúde adverte:
**EM GESTANTES, FUMAR PROVOCA
PARTOS PREMATUROS E O
NASCIMENTO DE CRIANÇAS COM
PESO ABAIXO DO NORMAL.**



Disque Pare de Fumar
0800 703 7033

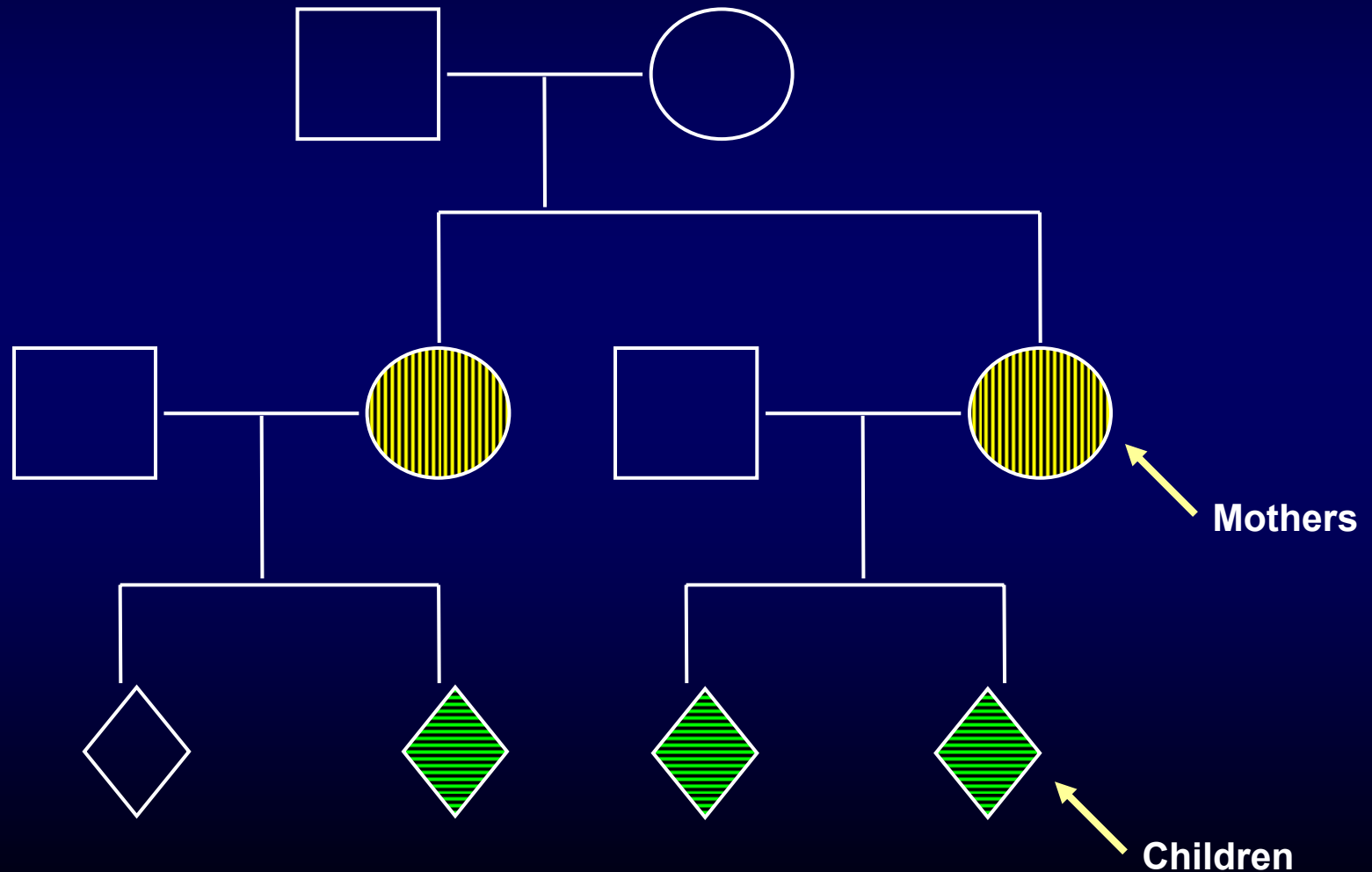
Risk factors for preterm birth

- Multiple gestation/ polyhydramnios
- Bleeding in the second trimester
- **History of preterm birth**
- **Preterm birth in previous pregnancy**
- Infections, such as bacterial vaginosis and bacteriuria
- Race/Low BMI
- Uterine factor
- Assisted fertilization technique
- Cigarette smoking
- Maternal disease (DTS/HTN)
- Periodontal disease
- Maternal stress
-



Prematuro

Family collection strategy expanded to include three generations



Candidate genes: Search strategy

- Linkage analysis
- Family association analysis: Transmission Disequilibrium Test (TDT)
- “Admixture” approach

Lista de genes candidatos prioritarios

Los posibles genes candidatos son:				
AG	FC/CT	RC/SC	NUT/CP	PD
HLA-A	TNFA	ADRB1	MTHFR	CYP1A1
HLA-B	IL8	ADRB2	Factor V	NAT1
HLA-G	IL1R2	Oxitocina	Trombina	NAT2
CARD15	IL2	PGE1	Factor II	OPRM1
ADAMT	IL6	PGE2	LDLR	GSTT1
	MMP1		APOE	COX1
	MMP9		RARA	COX2
	TNFB		CETP	NOS2

AG: factores inmunológicos y antigénicos; FC/CT: factores de crecimiento y citoquinas; RC/SC: receptores y señalización celular; NUT/CP: vías de nutrición y clothing; PD: vías de prostaglandinas y detoxificación.

**“Es propio de nuestra naturaleza mirar
incesantemente el futuro.”**

“El sistema está dispuesto de manera tal
que nuestras previsiones serán inciertas”

**Thomas Stearns Eliot
1888-1965**

Tetsuji Matayoshi

Mariana Ogawa

Mónica Sakurai

Andrea Figueroa

Celina Oyuela

María Marta Soto

M.Teresa Barcovich

Valeria Melia

Norma Ginzo

Paula Echavarría

Ana Turrín

ECLAMC

Diego Calvo

Horacio Aiello

Viviana Cosentino

Andrea Gadow

Laura Igarzábal

Santiago Lippold

Lucas Otaño

Jorge López Camelo

Hugo Krupitzki

Florencia Petracchi

Enrique Gadow

***Grupo de genética médica**

www.cemic.edu.ar
genetica@cemic.edu.ar



Carrera de especialización en genética médica

Título: Médico especialista universitario en genética médica

Lugar: CEMIC hospital universitario sede Saavedra

Requisitos de admisión: Título de grado: Médico

Otros requisitos: Dos años cumplidos de residencia o concurrencia en un servicio acreditado de una especialidad clínica o clínica quirúrgica

Plan de Estudio:

Duración 2 años. Carga horaria total: 3510 horas

Nº de graduados: 5

Acreditada por la CONEAU:

Resolución 1/12/98 nº 150/P27/98. Resolución 18/3/09 094/09 Categorización A.

Contacto: institutouniversitario@iuc.edu.ar, genetica@cemic.edu.ar