

# DISCREPANZA CVSc vs CVSm PER TRISOMIA 21 DA RESCUE INVERSO.



E-mail: [asensi@ausl-cesena.emr.it](mailto:asensi@ausl-cesena.emr.it)

**Turci A.\*, Racalbutto E.°, Innoceta A.M.\*, Camurri L.°, Marongiu A.#, Rosato S°, Voglino G.#, Sensi A.\***

\*UO Genetica Medica AVR AUSL Cesena, °Laboratorio Mendel Genetica Medica Modena,

#Laboratorio Citogenetica e Biologia Molecolare. Promea S.p.A, Torino.

Parole chiave: **trisomia21, discrepanza, diagnosi prenatale**

## introduzione

Circa 1-2% dei campioni di villi coriali(CVS) presentano un mosaicismo di cui solo dal 5 al 25% dei casi è confermato nel feto. Mosaicismi per le trisomie autosomiche rilevate dalla QF-PCR (cromosomi 13, 18 e 21) sono riportate in circa lo 0,26% dei CVS (Smith et al.,1999). Il mosaicismo placentare (CPM) quando presente può avere un grado differente nel mesenchima (CVSm) e nel citotrofoblasto (CVSc) in base allo stadio dell'embriogenesi in cui è insorto..

Le discrepanze tra cariotipo CVSc e CVSm hanno una distribuzione cromosoma specifica (Wolstenholme J. 1996) : per la trisomia del cromosoma 21 i falsi negativi sono più frequenti nella CVSc e sono ritenuti prevalentemente originati da errori postzigotici. Quando controllati molecularmente mediante QF-PCR risultano infatti frequentemente diallelici trisomici. Tuttavia, alcune discrepanze per falsi negativi per trisomia 21 in QF-PCR, rilevati come trisomici al cariotipo CVSm, hanno poi evidenziato un pattern triallelico delle cellule in coltura, evidenziando la origine meiotica dell'errore non disgiuntivo.

## Case report

La paziente è giunta all'esame prenatale con unica indicazione per eta materna avanzata, all'età di 42 anni , nullipara, epoca gestazionale 12° settimana, con plica nucale nella norma, in assenza di anamnesi familiare per patologia cromosomica e genetica specifica e parametri emato-chimici nella norma.

## Materiali e metodi

L'analisi citogenetica su prelievo di villo coriale è stata eseguita su coltura a breve termine (STC) a 48h con bandeggio QFQ a 320 bande (ISCN2009) con l'analisi di 50 metafasi e coltura a lungo termine (LTC) con bandeggio QFQ a 400 bande (ISCN2009) con l'analisi di 50 metafasi

L'esame citogenetico su amniociti eseguita in 16<sup>o</sup> settimana con analisi di 60 metafasi da 32 cloni in situ di 4 colture indipendenti con bandeggio QFQ a 400 bande (ISCN2009)

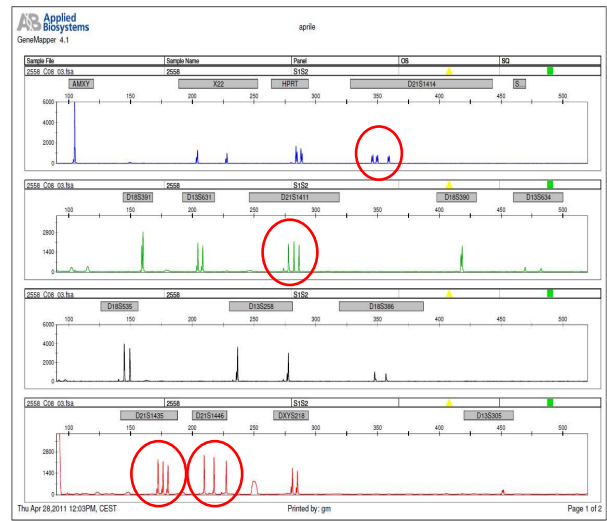
La QF-PCR è stata condotta su villo in toto e su amniociti non coltivati utilizzando 25 ng di DNA estratto con Termolisi con CHELEX 100 mini kit, PCR multiplex con STRs specifici per aneuploidie cromosomi 13,18,21,X e Y con tecnologia ANEUFASST a 5 colori pannello S1/S2 base con 21 STRs di cui 5 specifici per cromosoma 21 e pannello di conferma M21 specifico per cromosoma 21 con 5 STR di cui 3 non presenti in pannello S1/S2 (certificazione IVD/CE 98/79/60, ISO 13485:2003) ed elettroforesi capillare con ABIPRISM 3500 Genetic Analyzer, software di analisi GeneMapper 4.1. Per i marcatori risultati triallelici il rapporto tra i picchi relativi ai singoli STRs è stato calcolato dall'area dell'allele più corto divisa per l'area di ciascuno degli altri 2 alleli :  $\text{area picco1/area picco2}$  e  $\text{area picco1/area picco3}$  tenendo come range di normalità il rapporto 1:1:1 (range 0,75-1,44) e la percentuale di mosaico è stata stimata dividendo l'area dell'allele meno rappresentato (caratterizzante la linea trisomica) per l'area di ciascuno degli altri 2 alleli (che sono rappresentati sia nella linea trisomica che disomica)

## Risultati

La diagnosi prenatale condotta su villo coriale ha evidenziato una discrepanza tra analisi citogenetica su coltura a breve termine risultata 46,XX omogenea e coltura a lungo termine risultata 47,XX,+21 omogenea.

La QF-PCR allestita su CVS non coltivato ha evidenziato un assetto microsatellitare compatibile con trisomia triallelica a mosaico per il cromosoma 21 su tutti gli STRs specifici per il cromosoma 21 utilizzati sia con il pannello S1/S2 che con il pannello di conferma cromosoma specifico M21. La valutazione del mosaico identificato mediante QF-PCR ha stimato marcatore per marcatore la presenza di un mosaico per trisomia triallelica 21 in un range 65-80%. (Fig.1A) La coltura a breve termine del villo ha evidenziato un cariotipo femminile normale 46,XX omogeneo. La coltura a lungo termine ha evidenziato un cariotipo femminile a 47,XX,+21 omogeneo.

La trisomia 21 omogenea è stata confermata su liquido amniotico. L'esame citogenetico su amniociti con analisi di 60 metafasi da 32 cloni in situ ha confermato il risultato 47,XX+21 omogeneo e l'esame molecolare con QF-PCR su DNA estratto da amniociti ha confermato assetto microsatellitare per il cromosoma 21 con trisomia triallelica omogenea.(Fig.1B)



A

B

Fig.1 A:L'analisi qf-pcr eseguita su villi coriali in toto evidenzia un assetto microsatellitare compatibile con una trisomia triallelica per il cromosoma 21, a mosaico stimata in un range compreso tra il 65-80%. B:l'esame molecolare con qf-pcr su dna degli amniociti, conferma l'assetto microsatellitare per il cromosoma 21 con trisomia triallelica omogenea.

## Discussione

Al fine di comprendere meglio il significato dei risultati ottenuti dall'analisi citogenetica e molecolare, precisiamo che la CVSc valuta l'assetto del citotrofoblasto e l'analisi QF-PCR su DNA estratto da villo in toto valuta sia il tessuto citotrofoblastico che mesenchimale da cui è costituito in proporzione variabile, stimata in media del 50% anche se risulta differente in base alla porzione di villo considerata- 70-30%.(Waters JJ, et al. 2007.)

I risultati congiunti della CVSc e della QF-PCR su DNA estratto da villo concordano quindi per un concepimento trisomico per errore meiotico (o mitotico premeiotico) sulla base del triallelismo per il cromosoma 21 evidenziato dalla QF-PCR e successivo “rescue inverso” precoce con correzione confinata al trofoblasto e possibile espansione preferenziale della linea disomica a scapito della trisomica (Kalousek DK. et al.2000) (evidenziato dai risultati della CVSc che hanno dato 46,XX omogenea) (Fig.2)

I risultati della CVSm cariotipo su amniociti e relativa QF-PCR confermano l'omogeneità della trisomia nel feto.

Pur nella limitatezza quantitativa del tessuto esaminato i risultati molecolari e citogenetici appaiono coerenti con una discrepanza completa tra citotrofoblasto e mesenchima.

L'osservazione conferma la possibilità di rescue inverso per la trisomia 21 e rinforza la raccomandazione di privilegiare CVSm rispetto a CVSc in caso di scarsità del campione.

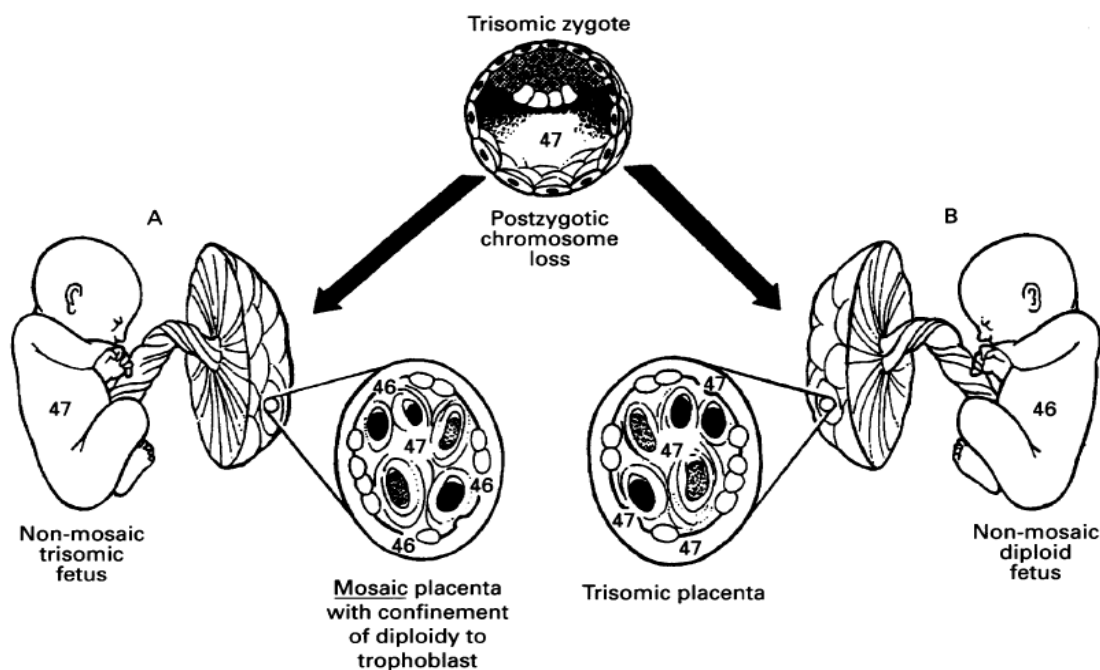


Figure 2 Diagram illustrating trisomic zygote rescue. (A) Intrauterine survival of trisomic fetus correlates with the presence of a diploid cell line in the cytotrophoblast owing to early postzygotic mitotic loss of the trisomic chromosome. (B) A mitotic mutation in the embryonic progenitor cells results in a diploid fetus and trisomic placenta.

Fig.2 (A)

