



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Tesi di Laurea in

Biologia molecolare e applicata

**Ottimizzazione della diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche
numeriche e strutturali mediante la tecnologia NGS**

**Optimization of prenatal diagnosis of numerical and structural
chromosomal anomalies using NGS technology**

Laureanda

SIMONA BENUCCI

Relatore

Prof. ssa OLIANA CARNEVALI

Correlatore

Dr. FEDERICO GABRIELLI

Sessione Autunno 2021

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1.	INTRODUZIONE	1
1.1.	La diagnosi prenatale	1
1.2	Il DNA fetale	7
1.3	Cause che determinano l'aumento del cfDNA.....	16
1.4	Analisi delle aneuploidie attraverso Non invasive prenatal testing (NIPT)	18
2.	SCOPO	21
3.	MATERIALI E METODI.....	23
3.1	Pazienti e raccolta dei campioni	23
3.2	Isolamento del DNA fetale (cfDNA) da plasma	24
3.3	Preparazione delle librerie e size-selection	27
3.4	Emulsion PCR	30
3.5	Sequenziamento attraverso tecnologia Ion torrent	31
3.6	Calcolo della frazione fetale	35
3.7	Analisi bioinformatica delle Anomalie strutturali e numeriche	36
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	37
5.	CONCLUSIONI	45
6.	BIBLIOGRAFIA	48

1. INTRODUZIONE

1.1 La diagnosi prenatale

La diagnosi prenatale è l'insieme delle procedure atte a valutare la presenza di anomalie a carico del feto. La diagnosi prenatale può essere realizzata attraverso metodiche invasive e non invasive.

Le metodiche invasive comprendono:

- Villocentesi
- Amniocentesi

Le metodiche non invasive sono:

- Bi-test o test combinato
- Analisi del DNA fetale estratto da plasma materno

Le principali metodiche di diagnosi prenatale si suddividono in test di screening e test diagnostici.

Sono definiti test di screening le indagini a cui tutte le donne sono invitate a sottoporsi in gravidanza, allo scopo di individuare un rischio aumentato per una data patologia a carico del feto, e suggerire un eventuale ricorso alle indagini diagnostiche per una sua precisa definizione.

I test di screening non invasivi attualmente disponibili prevedono la valutazione della concentrazione di marcatori biochimici, come la beta gonadotropina corionica umana (β -hCG) e la proteina A plasmatica associata alla gravidanza (PAPP-A), che costituiscono nel loro insieme il Bi-test, a cui

vengono associati la valutazione ecografica della translucenza nucale fetale e altri parametri ecografici, utili per la determinazione del rischio aumentato per patologie fetali.

I risultati ottenuti vengono messi in relazione con l'età materna e l'epoca gestazionale.

La translucenza nucale fetale indica lo spessore retronucleare del feto, il cui aumento è spesso correlato ad un rischio maggiore di feto affetto da trisomia 21 o altre anomalie genetiche.

La misura della translucenza nucale e l'età materna, combinata con la quantificazione dei due marcatori biochimici, β -hCG e PAPP-A, costituiscono nell'insieme il "test combinato", che viene eseguito tra la 11a e la 13a settimana di gestazione e permette di valutare il rischio che il feto sia affetto da trisomia 13, 18 o 21.

La proteina plasmatica associata alla gravidanza (PPAP-A) è prodotta dal trofoblasto placentare e, generalmente, la sua concentrazione aumenta rapidamente nel sangue materno durante il primo trimestre mentre si riduce sensibilmente nel caso di feti affetti da trisomia 21.

La free beta hCG è la subunità beta presente in forma libera della proteina hCG (Gonadotropina Corionica Umana) prodotta dalla placenta durante la gravidanza. Essa raggiunge un picco di concentrazione tra l'8a e la 10a settimana di gravidanza ed è presente in concentrazioni maggiori nel sangue di madri con feto affetto da sindrome di Down.

Attraverso tali test di screening è quindi possibile individuare le donne nelle quali è evidente un aumentato rischio di anomalie cromosomiche fetali e per le quali può essere indicato un test diagnostico prenatale invasivo. Il Bi-test identifica più del 90% dei feti affetti e qualora emerga un aumentato rischio per anomalie cromosomiche, la coppia valuterà l'iter diagnostico da seguire. Non sono però da escludere casi di risultati “falsi positivi” e “falsi negativi”. Nel primo caso, si suggerisce alla coppia un'indagine di diagnosi invasiva per verificare l'assenza della malattia, mentre nel secondo caso potrebbe esservi una mancata diagnosi di malattia e la nascita di un bambino affetto. Il Bi-test ha una detection rate di circa il 90% per la predizione della trisomia 21, con una percentuale di falsi positivi pari a circa il 5%.

I test di screening però forniscono esclusivamente una stima della probabilità di avere un figlio affetto da aneuploidie, mentre la diagnosi certa può essere eseguita soltanto attraverso l'analisi del cariotipo fetale o lo studio molecolare dei “geni-malattia”. (Nicholas M. LeFevre, Richard L. Sundermeyer 2020).

Le Linee Guida per i Test Genetici raccomandano il ricorso alla diagnosi prenatale qualora si verifichi una delle seguenti condizioni:

- Presenza di rischio procreativo prevedibile a priori, ad esempio: età materna avanzata (maggiore o uguale ai 35 anni); genitore portatore di anomalie cromosomiche strutturali; genitori portatori di mutazioni geniche.

- Presenza di un rischio fetale reso evidente nel corso della gestazione, esempio: le malformazioni evidenziate all'ecografia; positività dei test di screening; malattie infettive materne insorte in gravidanza.

L'amniocentesi consiste nel prelievo ecoguidato di liquido amniotico contenente cellule fetali (amniociti) derivate dallo sfaldamento cutaneo dell'epitelio del tratto gastroenterico, urogenitale, respiratorio e delle membrane amniotiche. Tale procedura è generalmente effettuata attorno alla 15a-16a settimana di gestazione.

Sugli amniociti possono essere eseguite indagini citogenetiche per la determinazione del cariotipo fetale e in alternativa analisi molecolari finalizzate all'identificazione di mutazioni genetiche responsabili di malattie monogeniche.

Il prelievo dei villi coriali (villocentesi), viene eseguito intorno alla 11a -12a settimana e consiste nel prelievo transaddominale del "chorion fondosum".

Il tessuto trofoblastico, preventivamente separato dalla decidua materna, può essere utilizzato per l'esecuzione di indagini citogenetiche eseguibili sulle metafasi spontanee del citotrofoblasto oppure sulle metafasi ottenute da cellule in coltura.

Un aspetto da tenere in considerazione nell'applicazione di questa tecnica è che, nel prelievo dei villi coriali, vengono asportate anche cellule materne

derivanti dalla decidua. E' necessario quindi che queste vengano rimosse per evitare errori diagnostici derivanti da contaminazione materna.

La villocentesi ha il vantaggio di poter essere eseguita più precocemente rispetto all'amniocentesi. Tuttavia a causa di mosaicismi confinati alla placenta, nell'1% dei casi si può osservare una discordanza di risultato tra l'assetto cromosomico stabilito durante le indagini citogenetiche e il reale cariotipo del feto. In questi casi si rende necessaria la ripetizione del test prenatale attraverso l'amniocentesi.

In Italia vengono effettuati oltre 100.000 prelievi di amniocentesi l'anno e il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è calcolato in circa 1:200 ma varia molto in rapporto all'esperienza dell'operatore (www.salute.gov.it).

Nel lavoro pubblicato da Jindal and Chaudhary (2021), sono riportate le cause di aborto indotte da amniocentesi:

- Il tasso di perdita fetale associato all'amniocentesi è in media dello 0,11%. La perdita è dello 0,56% entro 28 giorni e dello 0,09% entro 42 giorni.
- Perdita di liquido amniotico va dall'1% al 2% e solitamente associata alla chiusura spontanea delle membrane.
- Rischio dal 2% al 3% di sanguinamento vaginale.
- Rischio stimato di 2,6% di emorragia fetomaterna
- Rischio di introduzione di batteri della pelle nella cavità amniotica.

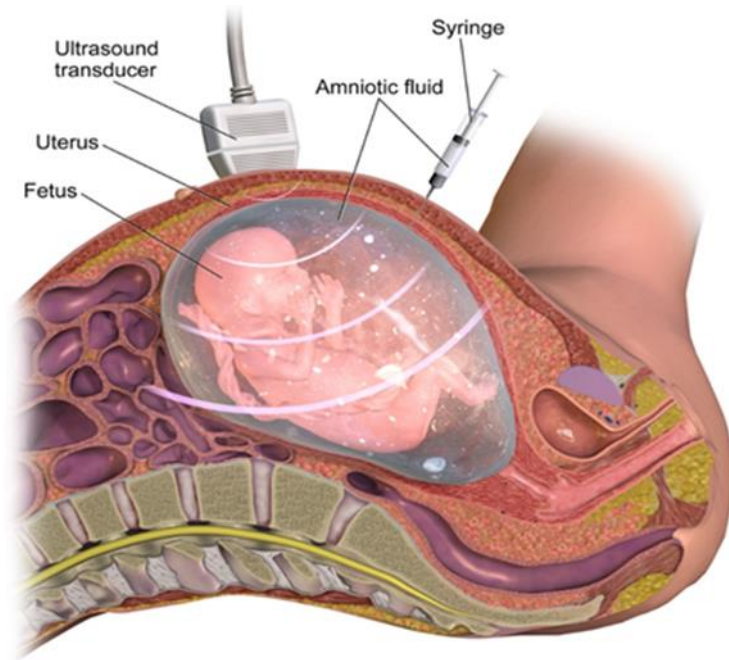


Fig. 1 Illustrazione grafica del prelievo amniotico

(<https://www.istitutovarelli.it/diagnostica-di-laboratorio/diagnosi-prenatale/nipt.html>)

Questi limiti spiegano come la meta auspicata da coloro che operano in ambito diagnostico prenatale sia la possibilità di effettuare una diagnosi senza ricorrere a tecniche invasive, eliminando quindi i rischi a carico del feto.

Diversi gruppi hanno orientato i loro studi sulla ricerca di cellule fetali nucleate (eritroblasti) nel circolo periferico materno ma senza successo. Le cellule fetali sono rare nel circolo sanguigno e la mancanza di anticorpi specifici ha reso difficile l'isolamento del DNA fetale, inducendo i ricercatori ad abbandonare questo approccio. Questi limiti hanno spinto i ricercatori allo studio di fonti alternative di materiale genetico fetale e la scoperta del DNA

fetale libero nel plasma materno (Y. M. Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F. Chamberlain, Vik Rai, Ian L. Sargent, Christopher W. GRedman 1997) ha permesso, negli ultimi 25 anni, di studiare nuovi approcci utili ad analizzare le caratteristiche genetiche del feto.

1.2 Il DNA fetale

La presenza nel plasma di acidi nucleici liberi da cellule è stata descritta per la prima volta nel 1948 (P. Mandel, P. Metais 1948), anticipando di qualche anno la determinazione della struttura a doppia elica da parte di Watson e Crick (1953).

Negli anni '60 sono cominciati i primi studi relativi agli acidi nucleici liberi nella circolazione sanguigna, è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di DNA circolante libero nel siero di pazienti affetti da lupus eritromatoso sistemico (Olfat M.HendyaTawfik Abdel Motalibb Mona A.El ShafiecFatma A.KhalafdSobhy E.KotbeAzizaKhalilfSalwa R.Alig 2016), e di pazienti affetti da artrite reumatoide (Teppe Hashimoto , Kohsuke Yoshida, Akira Hashiramoto, Kiyoshi Matsui 2021). Contemporaneamente nello stesso anno è stato dimostrato un aumento della concentrazione del DNA libero circolante nel siero dei pazienti affetti da cancro (Stanislav Volik, Miguel Alcaide, Ryan D. Morin, and Colin Collins 2016); si è riscontrato inoltre che tale concentrazione è maggiore in presenza di metastasi e, in

alcuni casi, i livelli diminuiscono nei pazienti trattati con un'efficace terapia antitumorale (Wepping Wang, Ming Liang, 2017). A causa delle limitate tecnologie di quegli anni, tuttavia, non è stato possibile determinare la precisa origine cellulare del DNA libero nei pazienti affetti da tumori. Soltanto a partire dalla fine degli anni novanta è stato possibile dimostrare che il DNA tumorale è presente in frammenti e che tale DNA è rilasciato da cellule tumorali in seguito ad apoptosi (Sasimol Udomruk, Santhasiri Orrapin, Dumnoensun Pruksakorn, Parunya Chaiyawat 2021).

In seguito a tali scoperte, l'interesse di molti ricercatori si è rivolto alla ricerca di altri tipi di DNA presenti nel plasma e nel siero. Il DNA virale è stato ampiamente studiato in quanto alcuni virus sono causa di sviluppo e progressione neoplastica, diventando marcatori specifici per tumori a causa virale (Jian-Yong Shao Yu-Hong Li, Hong-Yi Gao, Qiu-Liang Wu, Nian-Ji Cui, Li Zhang, Gang Cheng, Li-Fu Hu, Ingemar Ernberg, Yi-Xin Zeng 2004)

Le scoperte della presenza del DNA circolante a seguito di apoptosi cellulare causate da tumori e altre malattie ha dato un forte impulso ai ricercatori ad indagare sull'eventuale presenza di DNA fetale nella circolazione di donne in gravidanza.

Nel 1992 Strickland and Richards nel loro elaborato "Invasion of the trophoblasts", dimostrarono che i trofoblasti della placenta presentano caratteristiche paragonabili alle cellule tumorali.

La conferma che il feto potesse rilasciare DNA libero da cellule nel plasma

materno, arrivò qualche anno dopo. Lo e colleghi confermarono la presenza di DNA fetale in uno studio preliminare su un campione di 43 donne in epoca gestazionale compresa tra la 12a e la 40a settimana, di queste 30 erano in attesa di un feto di sesso maschile e 13 di un feto di sesso femminile. I campioni di DNA estratto dal plasma e dal siero materno vennero sottoposti a reazione di amplificazione per l'individuazione di sequenze specifiche del cromosoma Y (DSY14). Un segnale di amplificazione venne rilevato correttamente solo nelle donne in attesa di un feto di sesso maschile. Al contrario non venne osservato nessun segnale di amplificazione nel plasma delle 13 donne in attesa di un feto di sesso femminile. I risultati così ottenuti hanno consentito di dimostrare per la prima volta che nel plasma delle donne in gravidanza è presente materiale genetico di origine fetale (Imran Rafi, Melissa Hill, Judith Hayward, Lyn S. Chitty 2017).

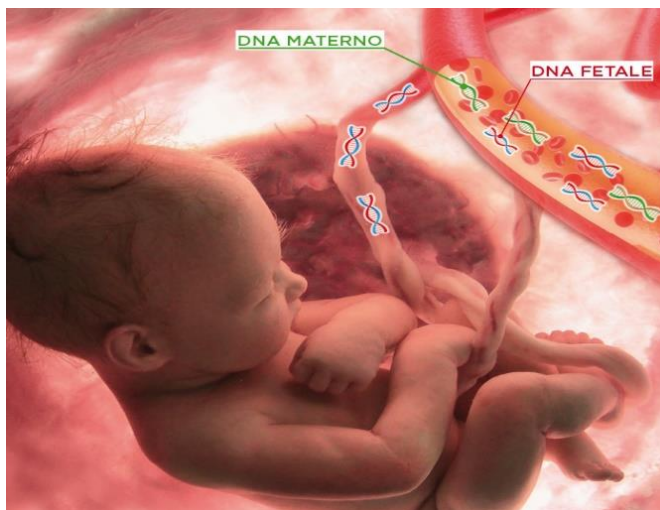


Fig. 2 Illustrazione grafica DNA fetale-materno
(<https://www.istitutovarelli.it/diagnostica-di-laboratorio/diagnosi-prenatale/nipt.html>)

Il cfDNA origina dalla lisi delle cellule materne e placentari. A partire dalla V settimana di gestazione, il citotrofoblasto placentare si ancora alla decidua parietale uterina, le arterie spirali deciduali irrorano le lacune presenti tra la decidua e la placenta, il citotrofoblasto invade e tappezza le pareti delle arterie uterine spiraliformi e le rimodella. Il turnover delle cellule del trofoblasto, che ricopre le pareti delle arterie spiraliformi, mediato dalle citochine, libera il cfDNA.

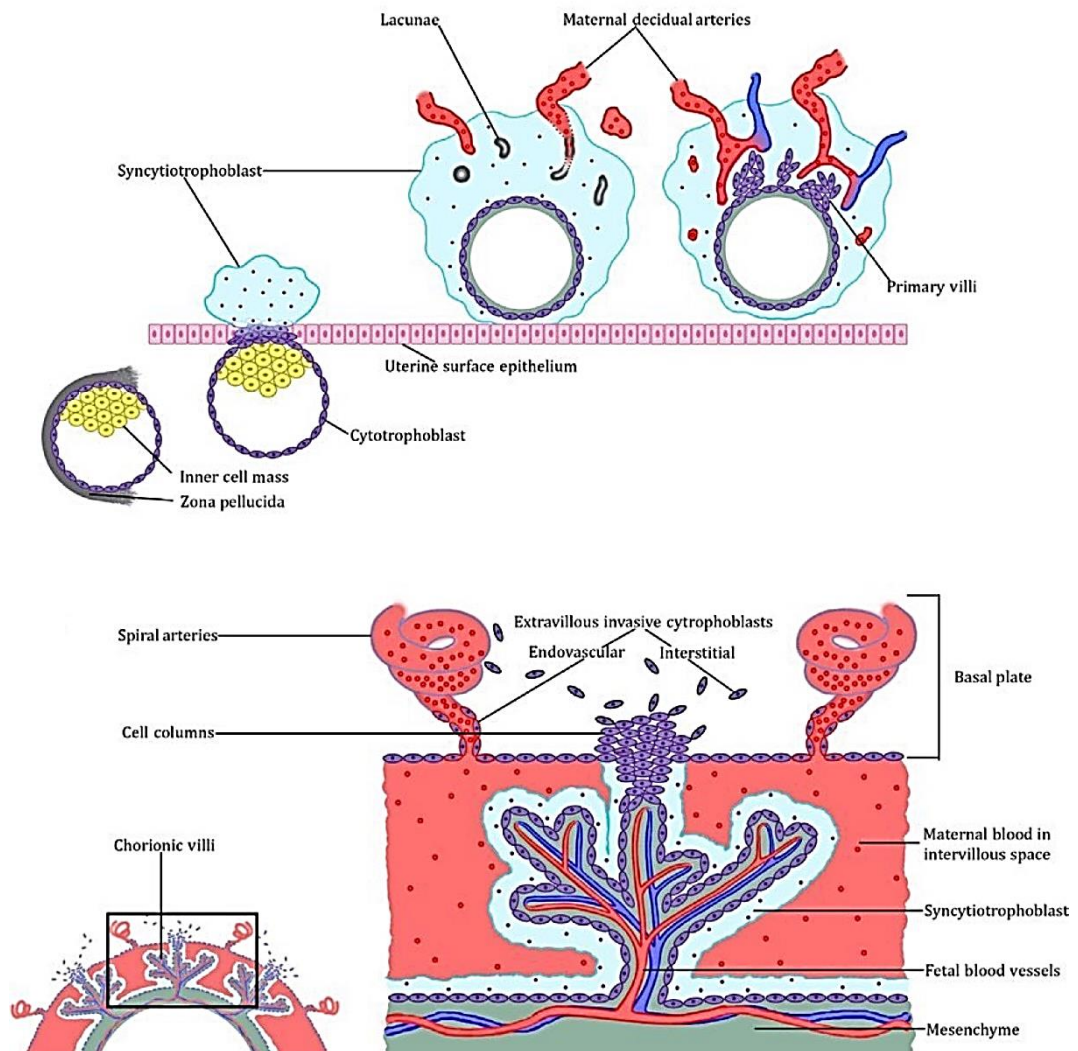


Fig 3 Illustrazione grafica del turnover delle cellule del trofoblasto (Ashwin Agarwal, Lauren C Sayres, Mildred K Cho, Robert Cook-Deegan, Subhashini Chandrasekharan 2013)

Il DNA libero nel circolo materno si presenta come una miscela di frammenti di acidi nucleici aventi due distinte origini: la madre e il feto.

Il primo obiettivo è stato quello di verificare la concentrazione del DNA fetale rispetto a quello materno (Yuk Ming Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F. Chamberlain, Vik Rai, Ian L. Sargent, Christopher W. GRedman 1997). Ancora oggi, la valutazione della quota fetale contenuta nei campioni di DNA libero rimane un dato di fondamentale importanza per ogni studio intrapreso, dato che dalla percentuale di quota fetale dipende l'effettiva possibilità di poter condurre delle analisi sul DNA fetale circolante libero (cfDNA).

La quantità di cfDNA, come riportato in letteratura, è una frazione compresa tra 3% e 6% rispetto al DNA totale libero plasmatico, con concentrazioni più basse all'inizio della gravidanza e crescenti con il procedere della gestazione (Sung K. Kim, Gregory Hannum, Jennifer Geis, John Tynan, Grant Hogg, Chen Zhao, Taylor J. Jensen, Amin R. Mazloom, Paul Oeth, Mathias Ehrich, Dirk van den Boom and Cosmin Deciu 2015).

Il DNA circolante libero, sia quello di origine fetale che quello materno, non è rappresentato da grandi molecole di acidi nucleici ma si presenta frammentato, con lunghezze di 200bp (Jonatan Blais, Sylvie Giroux, André Caron, Valérie Clément, François Rousseau 2019). Questi frammenti di DNA sono liberati nel flusso sanguigno in seguito ad apoptosi delle cellule del trofoblasto.

L'induzione dell'apoptosi delle cellule del trofoblasto avviene tramite dei

recettori di membrana “death receptors”; questi recettori appartengono ad una famiglia genica che comprende recettori simili a TNF-R, il recettore presente si chiama Fas.

Fas una volta legato al suo ligando FasL provoca la trasduzione del segnale di morte, attraverso i suddetti domini death e il reclutamento di particolari proteine adattatrici. Tali proteine, attraverso i DEDs (death effector domains) causano la formazione di un complesso molecolare che porta all’attivazione delle caspasi iniziatrici (caspasi 8).

Le caspasi sono una famiglia di proteine che sono le principali esecutrici del processo apoptotico.

Sono delle cisteina proteasi che tagliano proteine a livello di residui di acido aspartico (da cui C-ASP-asi).

La caspasi 8 attiva la caspasi 3 (effettrice), l’attivazione della caspasi 3 attiva una DNasi citoplasmatica (CAD), usando come substrato un inibitore dell’enzima (ICAD)

L’attivazione di CAD determina la frammentazione del DNA in unità nucleosomiali, infatti idrolizza il DNA ogni 200 nucleotidi circa , agendo a livello del DNA linker, a causa dell'effetto di impedimento sterico, la nucleasi non può quindi accedere ai frammenti di DNA avvolti attorno al nucleosoma.

La DNasi CAD scinde il DNA solo nelle regioni distanziatrici tra i nucleosomi, il che spiega perché il DNA viene degradato in unità nucleosomiali (Taiki Watanabe, Shuhei Takada, Ryushin Mizuta 2019).

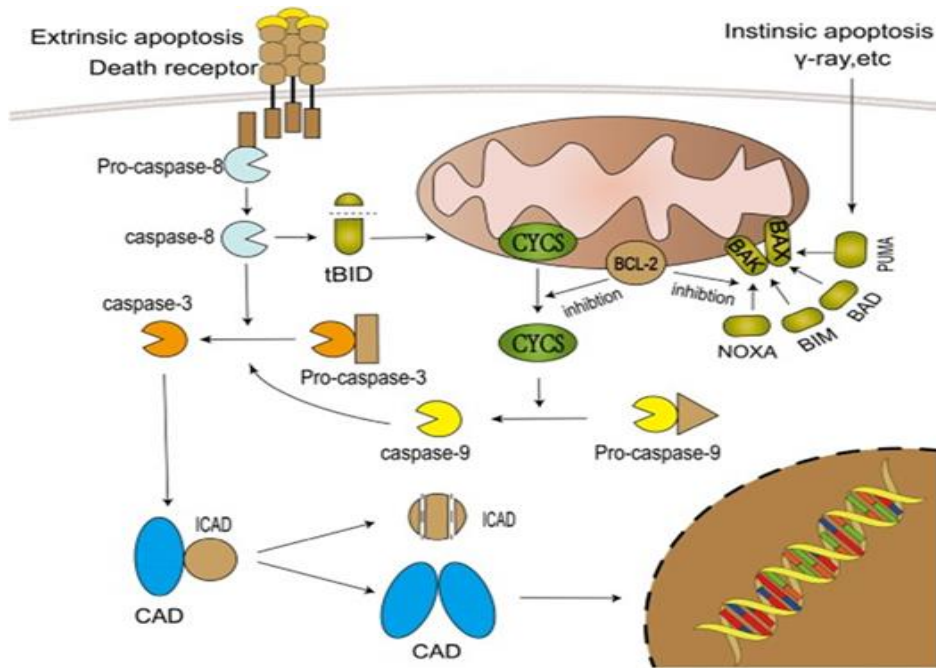


Fig 4 Illustrazione del meccanismo apoptotico (Taiki Watanabe, Shuhei Takada, Ryushin Mizuta 2019).

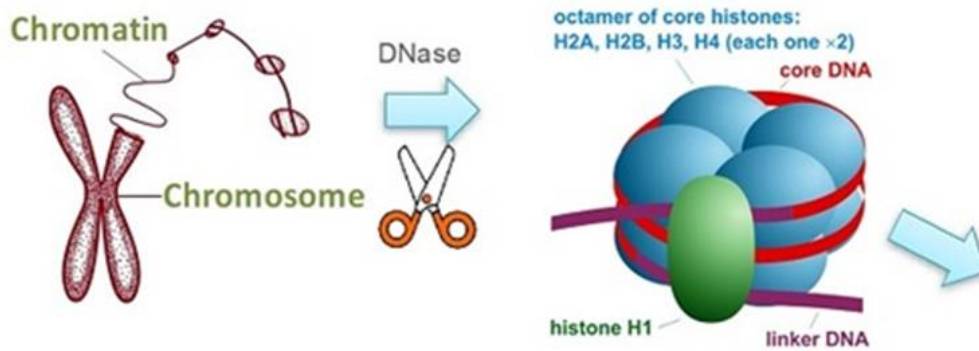


Fig 5 Illustrazione dell'azione della Dnasi (<https://www.toppr.com/ask/content/concept/advanced-knowledge-of-packaging-of-dna-helix-202327/>)

Nello specifico, osservando il grafico di fig.6 della distribuzione delle lunghezze dei frammenti del DNA libero mostraIl DNA libero di origine

materna è infatti costituito da frammenti di lunghezza media pari a 166 bp, corrispondenti al DNA avvolto attorno al core nucleosomale (circa 146 bp) e da un frammento di DNA linker (20 bp). Il DNA fetale mostra invece una prevalenza di frammenti di 143 bp e di frammenti di dimensioni inferiori che mostrano una periodicità di 10 bp dovuta al clivaggio del DNA ad opera delle nucleasi. Tali osservazioni hanno ulteriormente confermato che l'apoptosi rappresenta il principale meccanismo fisiologico alla base dell'origine del DNA libero circolante., evidenza che permette inoltre di consolidare l'ipotesi secondo cui il DNA libero nel plasma derivi da apoptosi cellulare (Nazanin Yeganeh Kazemi, Bohdana Fedyshyn, Isabel Yelsa, Yaroslav Fedyshy, Rodrigo Ruano, Svetomir N. Markovic, Rana Chakraborty, Elizabeth Ann L. Enninga 2021).

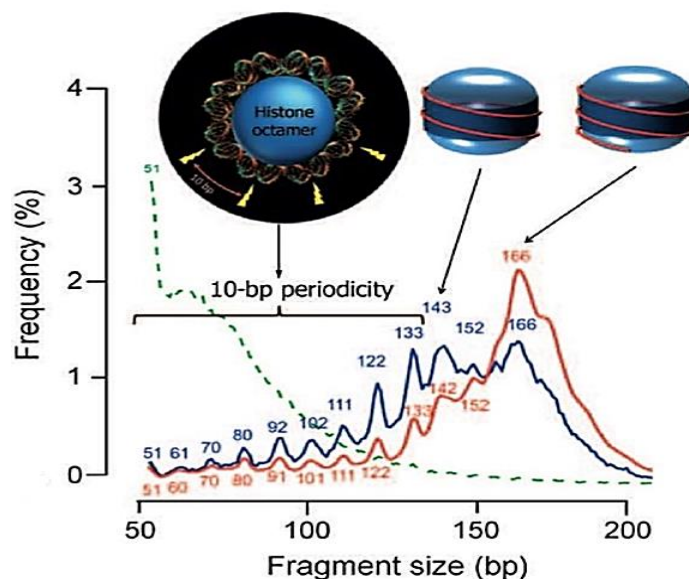


Fig. 6 Distribuzione delle dimensioni del DNA fetale (blu), DNA totale (rossa) e DNA mitocondriale (verde) (Lo et al. 2010).

Quale fosse la fonte di DNA fetale, è stata una delle prime domande a cui i ricercatori hanno cercato di dare risposta. Ci sono due testimonianze a sostegno che il cfDNA derivi dall'apoptosi del sinciziotrofoblasto; la prima ipotesi è che gravidanze anembrioniche mostrano livelli di cfDNA pari a quelli di gravidanze normali in pari età gestazionale (Lisheng Liu, Hua Li, Ning Wang, Xingguo Song, Ke Zhao, Cong Zhang 2021); la seconda, è che, dai diversi studi mirati alla definizione del pattern epigenetico del DNA fetale, è emerso come le molecole di DNA fetale libero mostrino la stessa marcatura epigenetica delle cellule placentari (Ji Hyae Lim, Bom Yi Lee, Jin Woo Kim, You Jung Han, Jin Hoon Chung, Min Hyoung Kim, Dong Wook Kwak, So Yeon Park, Hee Back Choi, Hyun Mee Ryu 2018)

A evidenziare l'esistenza del cfDNA, è stata la scoperta di marcatori epigenetici, i quali subivano una diversa metilazione tra cellule materne e cellule fetali. Poiché la placenta è la principale fonte di cfDNA, in essa sono stati cercati patterns di metilazione specifici .

Nel 2005 è stato individuato il primo marcatore fetale universale; è stato infatti dimostrato che la regione del promotore SERPINB5 del gene che codifica per la proteina maspina, la quale risulta ipometilata nelle cellule placentari e ipermetilata nelle cellule ematopoietiche materne.

Altri esempi di marcatori epigenetici fetali che sono stati sviluppati sulla base del modello di metilazione specifico della placenta includono il primo esone del gene *RASSF1A* e il promotore del gene *HLCS* (holocarboxylase

synthetase). Entrambi sono ipermetilati nella placenta e ipometilati nelle cellule ematopoietiche materne (Dana W.Y. Tsui, Rossa W.K. Chiu, and Y.M. Dennis Lo 2010).

L'eliminazione del DNA fetale avviene in due fasi differenti: la prima, che mostra una cinetica molto veloce, nella quale in un ora circa dal parto viene dimezzata la percentuale di cfDNA; la seconda, più lenta, porta ad un ulteriore dimezzamento entro 13 ore circa. Dopo 2 giorni dal parto non sarà più presente DNA fetale libero, questo è importante perché permetterà di effettuare una nuova analisi (Stephanie C Y Yu , Shara W Y Lee, Peiyong Jiang, Tak Y. Leung, K. C. Allen Chan, Rossa W. K. Chiu, Y M Dennis Lo 2013)

1.3 Cause che determinano l'aumento del cfDNA

Altri fattori che influenzano la quantificazione della frazione fetale oltre all'età gestazionale come menzionato precedentemente, sono:

- L'indice di massa corporea della madre (BMI)
- La presenza di aneuploidie fetali
- Patologie materne legate alla gravidanza
- Eventuali gravidanze gemellari

Recenti studi hanno dimostrato che l'indice di massa corporea (BMI) materno influenza la concentrazione del cfDNA nel plasma materno.

L'obesità, è associata alla presenza di frazioni fetali inferiori (Maeve K. Hopkins, Nathanael Koelper, Samantha Caldwell, Brittany Dyr, Lorraine Dugoff 2021), questo fenomeno potrebbe essere correlato all'aumentato volume della circolazione materna che si traduce nella maggiore diluizione del DNA fetale (Luigi Carbone , Federica Cariati, Laura Sarno, Alessandro Conforti, Francesca Bagnulo, Ida Strina , Lucio Pastore, Giuseppe Maria Maruotti, Carlo Alviggi 2020). In alternativa, la ridotta frazione fetale potrebbe essere causata da un aumento degli eventi apoptotici o di necrosi a carico della frazione stromo-vascolare e del tessuto adiposo in donne obese in gravidanza (Nazanin Yeganeh Kazemi, Bohdana Fedyshyn, Isabel Yelsa, Yaroslav Fedyshyn, Rodrigo Ruano, Svetomir N. Markovic, Rana Chakraborty, Elizabeth Ann L. Enninga 2021)

Poiché il rilascio di cfDNA è strettamente legato alla morfogenesi della placenta, le patologie legate alla gravidanza possono influire sulla sua concentrazione nel plasma materno. La preeclampsia è uno degli esempi meglio studiati (Yi Wu, Ana Werlang, Weiwei Cheng, Andrea Lanes, Shi Wu Wen, Mark Walker, 2021), infatti lo stress ossidativo ad essa correlato determina un aumento dell'apoptosi dei trofoblasti e del rilascio di microparticelle del sinciziotrofoblasto, che si traduce in un incremento del cfDNA liberato nel sangue materno.

Nella preeclampsia (gestosi), i valori risultano essere superiori di ben 5 volte rispetto alle gravidanze normali (Y. M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F.

Chamberlain, Vik Rai, Ian L. Sargent, Christopher W. GRedman 1997), probabilmente la preeclampsia è accompagnata da un difetto nella clearance del DNA embrio-fetale dal plasma materno, spiegando almeno in parte l'aumento nella circolazione materna. Altri disturbi della gravidanza associati ad un aumento del cfDNA sono:

il parto prematuro, la morte intrauterina del feto e l'emorragia fetomaterna. Risulta evidente l'importanza del cfDNA nel monitorare la gravidanza. Dal momento che aumenta in diverse patologie, esso non è un marcatore specifico ma generico, che avverte di un rischio legato alla gravidanza, da indagare ulteriormente.

1.4 Analisi delle aneuploidie attraverso Non invasive prenatal testing (NIPT)

Le aneuploidie sono variazioni nel numero dei cromosomi, rispetto all'assetto che normalmente caratterizza le cellule di un individuo. Nell'uomo il normale assetto è determinato da un cariotipo 46, XY. La perdita o l'acquisizione di un cromosoma, autosoma o cromosoma sessuale, determina uno sviluppo anomalo o in casi più gravi può indurre ad aborto spontaneo nelle prime settimane di gestazione. Le aneuploidie autosomiche compatibili con la vita, sono le trisomie dei cromosomi 21, 18, 13, rispettivamente sindrome di Down, sindrome di Edwards e sindrome di Patau. Possono verificarsi anche aneuploidie sessuali, meno gravi, come:

sindrome di Turner (X0), sindrome di Klinefelter (XXY), sindrome di Jacobs (XYY), sindrome della tripla X (XXX), XXXY e XYY.

Le anomalie cromosomiche riguardano anche alterazioni nella struttura dei cromosomi, come delezioni e duplicazioni, le conseguenze di tali anomalie dipenderanno dai geni coinvolti.

Nella maggior parte dei casi, le anomalie cromosomiche compaiono a caso, ma il rischio aumenta con l'aumentare dell'età materna, anche se non è stato ancora possibile dimostrare l'esistenza di un'età specifica al di sotto del quale non esistono rischi. L'età paterna, invece, non sembra incidere particolarmente sul rischio anche se, secondo la letteratura, più l'età del padre avanza più si manifestano delle mutazioni nel DNA dello spermatozoo che possono causare anomalie genetiche malformative. L'analisi del cfDNA per lo screening delle più comuni aneuploidie fetali costituisce una delle applicazioni di maggior successo ed è stato oggetto di ricerca da parte di diversi gruppi che, negli ultimi anni, hanno contribuito allo sviluppo di test prenatali non invasivi (NIPT). Il principio generale di questi test si basa sulla comparazione tra il numero dei frammenti del cromosoma coinvolto nell'aneuploidia con il numero dei frammenti in una condizione di disomia. Attraverso un avanzato processo tecnologico, le regioni cromosomiche del cfDNA vengono sequenziate a elevata profondità di lettura, mediante l'innovativa tecnologia di sequenziamento dell'intero genoma fetale, utilizzando sequenziatori *Next Generation Sequencing (NGS)*. Le sequenze

cromosomiche vengono infine quantificate attraverso un'analisi bioinformatica, utilizzando un software dedicato, per determinare la presenza di eventuali aneuploidie cromosomiche fetali (Sung K. Kim, Gregory Hannum, Jennifer Geis, John Tynan, Grant Hogg, Chen Zhao, Taylor J. Jensen, Amin R. Mazloom, Paul Oeth, Mathias Ehrich, Dirk van den Boom and Cosmin Deciu 2015).

È importante sottolineare che la NIPT, nonostante la sua elevata sensibilità, è considerato un test di screening, piuttosto che un esame diagnostico, pertanto è raccomandata la conferma di ogni risultato positivo attraverso le procedure di diagnosi invasive.

2. SCOPO DELLA TESI

I test prenatali non invasivi (NIPT) sono stati eseguiti e quindi commercializzati a partire dal 2011 (Ashwin Agarwal, Lauren C Sayres, Mildred K Cho, Robert Cook-Deegan, Subhashini Chandrasekharan 2013) attraverso l'analisi del DNA fetale circolante utilizzando la tecnologia NGS Illumina.

La tecnologia Illumina (VerySeq NIPT) è una tecnologia con dei costi elevati rendendo poco accessibile la piattaforma. L'obiettivo della tesi è stato quello di realizzare attraverso la piattaforma di sequenziamento Ion Torrent (ThermoFisher Scientific) una propria pipeline per la diagnosi delle aneuploidie strutturali e numeriche di tutti i cromosomi attraverso l'analisi del cfDNA.

Inizialmente il cfDNA è stato ottenuto da un prelievo di sangue periferico di 86 donne in gravidanza dalla decima settimana alla dodicesima settimana gestazionale. I campioni estratti un volta analizzati per valutarne la qualità e la quantità, sono stati utilizzati per la preparazione delle librerie di frammenti e selezionate attraverso una size-selection per ottenere i frammenti del cfDNA di interesse. Le librerie successivamente sono state sequenziate mediante sequenziatore GeneStudio S5 (IonTorrent technology).

Abbiamo valutato la qualità delle sequenze prodotte mediante l'algoritmo FastQC (esegue analisi, in questo caso do formato bam, producendo un report

che riassume i dati) e successivamente abbiamo utilizzato algoritmi precedentemente pubblicati per calcolare la frazione fetale (seqFF) e le anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi con l'algoritmo WisecondorX

Le aneuploidie indicano una variazione del numero di cromosomi, le più comuni per i cromosomi autosomici sono le trisomie 13, 18 e 21; mentre per quanto riguarda i cromosomi sessuali sono la sindrome di Turner (X0), sindrome di Klinefelter (XXY), sindrome di Jacobs (XYY), sindrome della tripla X (XXX).

Le anomalie strutturali riguardano alterazioni cromosomiche e strutturali (duplicazioni e microdelezioni) a carico di ogni cromosoma del cariotipo fetale.

La buona qualità delle sequenze è fondamentale per ottenere una baseline di campioni negativi utilizzata dall'algoritmo per l'analisi di campioni per la ricerca di anomalie cromosomiche.

La buona qualità dell'analisi NIPT dipende anche dalla quantità del cfDNA.

La frazione di DNA fetale è influenzata dall'età gestazionale e dall'indice di massa corporea (BMI) (Sofie Kruckow, Palle Schelde, Lotte Hatt, Katarina Ravn, Olav Bjørn Petersen, Niels Uldbjerg, Ida Vogel, Ripudaman Singhw, 2019). Nella nostra analisi è stato messo in relazione il cfDNA con BMI.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti e raccolta campioni

Lo studio è stato condotto analizzando 86 donne.

L'età delle donne è compresa tra 25 e 40 anni.

Nella ricerca sono state incluse donne fumatrici (12), non fumatrici (74), 3 donne sottoposte a terapia anticoagulante, e una donna affetta da diabete mellito di tipo 1.

Nello studio sono state incluse anche 4 donne che hanno eseguito procreazione medicalmente assistita, di cui 1 ricevente ovulo esterno.

Inoltre erano presenti 3 donne sottoposte a terapia di anticoagulanti e acido folico (a causa di aborti ripetuti) e una donna avente diabete mellito tipo 2.

Dallo studio invece sono state escluse:

- Gestanti con gravidanze gemellari, (in caso di esito positivo il test non è in grado di discriminare quale dei due feti ne sia affetto)
- Gestanti affette da neoplasie
- Gestanti sottoposte a trapianto allogenico

Lo studio ha voluto porre l'attenzione al BMI (www.iss.it).

Dai dati ottenuti:

-15 donne risultano in sovrappeso (BMI >25);

-6 donne risultano obese (BMI > 30).

Il prelievo di sangue periferico è stato effettuato in provette di raccolta dedicate, Cell-Free DNA BCT (Streck©), che impediscono la lisi cellulare e la contaminazione genomica. Queste provette contengono una soluzione stabilizzante che inibisce la degradazione del DNA fetale libero e previene il rilascio di DNA genomico cellulare della gestante che porterebbe a una diluizione del DNA fetale. L'uso di queste provette consente inoltre di conservare il prelievo ematico a temperatura ambiente per dieci giorni prima dell'estrazione del DNA.

3.2 Isolamento del DNA fetale (cfDNA) da plasma

Entro dieci giorni dalla raccolta, il plasma è stato isolato mediante centrifugazione del campione ematico a 2000 g per 20 minuti, ottenendo così la separazione tra plasma e parte corpuscolata. Circa 1mL del plasma ottenuto è stato usato per isolare il cfDNA utilizzando QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (QIAGEN) e seguendo il protocollo fornito dal kit (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/cell-free-dna/qiaamp-minelute-ccfdna-kits/>).

Il cfDNA è stato quantizzato tramite corsa al 4150 Bioanalyzer (Agilent Technologies) utilizzando il kit Cell-free DNA ScreenTape (Agilent

Technologies) che permette di caratterizzare qualitativamente e quantitativamente il campione mediante elettroforesi capillare. I frammenti di DNA migrano sul tracciato elettroforetico in base alla loro lunghezza: quanto più corti, tanto più migrano velocemente. La concentrazione del cfDNA e il DNA del campione totale è automaticamente valutata dall'analisi con TapeStation Software. La ScreenTape Cell-free DNA ha una sensibilità di 20 pg/ μ L. Il codice a barre di ogni ScreenTape è univoco e permette di tenere traccia della corsia utilizzata in ciascun dispositivo, consentendo la tracciabilità dei risultati. Nella Fig. 7A è riportato il gel della corsa elettroforetica: in alto i frammenti più grandi, in basso quelli più piccoli. Il cfDNA è identificato nel range di circa 300 bp. Nella Fig. 7B l'elettroferogramma mostra il mononucleosoma, il suo dimerico e il DNA ad alto peso molecolare (HMW). I multimeri sono inclusi nella regione %cfDNA (50-700 bp) e sono separati dal DNA HMW che corrisponde al DNA genomico.

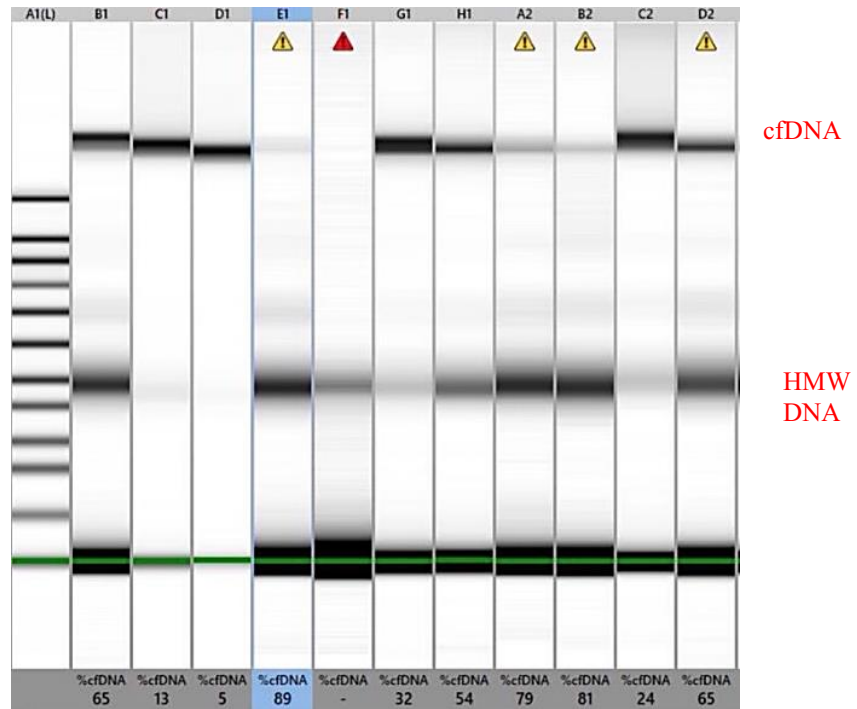


Fig 7A Profilo elettroforetico dei campioni, nella banda inferiore si presenta il cfDNA, invece nella superiore HMW DNA

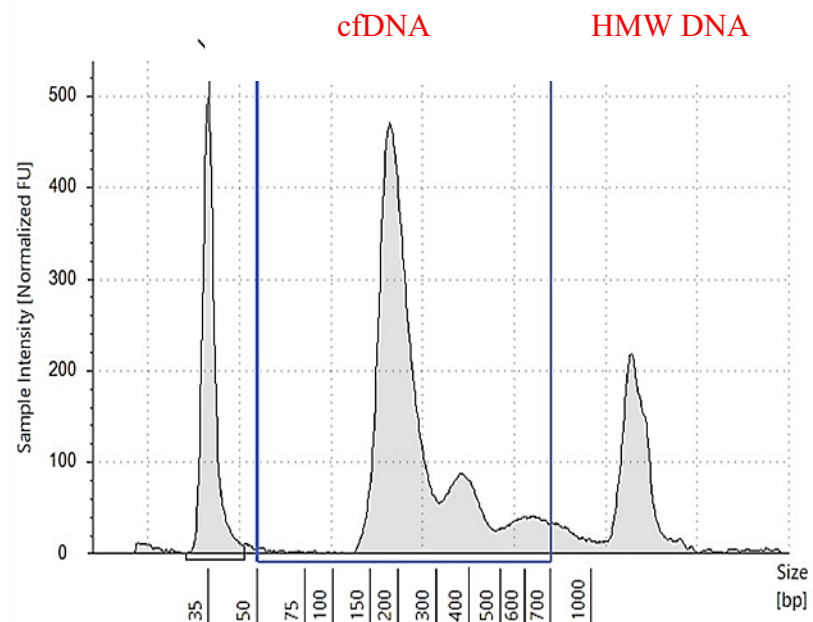


Fig. 7 B Caratteristico profilo del cfDNA analizzato con il saggio Cell-free DNA ScreenTape. il grafico fornisce informazioni sia sulle dimensioni che sulla concentrazione.

I campioni esaminati hanno una concentrazione di cfDNA di almeno 30 pg/ μ l, e quindi selezionati per l'analisi NGS.

3.3 Preparazione delle librerie e size-selection

La costruzione delle librerie è stata eseguita in accordo con il protocollo Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific) con alcuni aggiustamenti.

La preparazione della libreria è articolata nelle seguenti fasi:

1. DNA end Repair
2. Ligazione degli adattatori ai frammenti di DNA e purificazione della libreria
3. Quantificazione della libreria purificata e size-selection
4. Amplificazione della libreria e purificazione
5. Preparazione del pool per il caricamento del chip

È stato eseguito l'end-repair del cfDNA isolato dal plasma con l'obiettivo di ottenere frammenti lunghi 200-300 paia di basi con estremità "piatte". La reazione di frammentazione è eseguita a 37°C per 15 minuti utilizzando i

seguenti componenti:

- 5x End repair Buffer
- End Repair Enzyme
- cfDNA

Il prodotto della digestione enzimatica è purificato con il sistema Agencount AMPure XP (Beckman Coulter) ed eluito in Low TE.

Le singole librerie di DNA così generate sono state sottoposte al legame di sequenze di riconoscimento univoche (barcode). Il processo consente di attribuire in maniera univoca un barcode (da 1 a 32) ad ogni campione del pool destinato ad essere sequenziato utilizzando un unico chip semiconduttore. La reazione di “barcoding” è eseguita a 25°C per 30 minuti:

- Nuclease Free Water
- 10x Ligase Buffer
- P1 adapter
- DNA ligase
- Barcode (1-32)
- cfDNA-end repair

Al completamento della reazione, e dopo la purificazione, è necessario selezionare i frammenti della libreria ottenuta (300bp). Utilizzando il sistema delle biglie magnetiche si ha la selezione dei frammenti di DNA che rientrano

nell'intervallo di lunghezza adatto per la piattaforma di sequenziamento di nuova generazione.

Le librerie sono state amplificate utilizzando Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher) seguendo il programma di amplificazione:

Temperatura	Tempo	Stage
72°C	20 min	
95°C	5 min	
95°C	15 sec	14 cicli
58°C	15 sec	
70°C	1 min	
70°C	5 min	
4°C	∞	

Tabella1 Protocollo di amplificazione della libreria

Le librerie sono state purificate utilizzando le biglie magnetiche Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). Dopo l'amplificazione le librerie sono state sottoposte ad una double-size selection, utilizzando le biglie magnetiche per rimuovere, primers e DNA contaminante come il DNA genomico materno. Le librerie sono state quantificate mediante 4150 Bioanalyzer utilizzando la ScreenTape High SensivityD1000 (Agilent Technologies); infatti utilizzare una precisa concentrazione di template nella

fase di amplificazione clonale è necessaria per un corretto funzionamento della PCR ad emulsione. Una concentrazione troppo elevata genera policlonalità, che produce dati non analizzabili; al contrario, una concentrazione troppo bassa può causare la presenza di segnali troppo deboli e un'imprecisa rilevazione da parte dello strumento.

Una volta ottenute le concentrazioni di ciascun campione, i pool sono stati diluiti in maniera tale da ottenere una concentrazione finale di 60 pM e sottoposti a sequenziamento.

3.4 Emulsion PCR

L'amplificazione clonale delle librerie (e-PCR) è stata eseguita utilizzando lo strumento Ion Chef Systems (Thermo Scientific) in microreattori, costituiti da microbolle di acqua disperse in olio, all'interno delle quali si posizionano le Ion Sphere Particles (ISPs) sulla cui superficie si legano le molecole di DNA amplificate.

L'Emulsion PCR consiste nella preparazione di un'emulsione di acqua e olio in cui le microbolle d'acqua fungono da microreattori per le reazioni di PCR. All'interno della soluzione acquosa vengono preventivamente dispensati tutti i reagenti per la reazione di amplificazione unitamente a delle biglie di supporto su cui si legano i frammenti di DNA. Quando i reagenti sono presenti in quantità bilanciate, tra loro e rispetto ai volumi di acqua e olio, secondo la legge della distribuzione di Poisson, essi si distribuiranno i

maniera tale che ogni microreattore contenga un frammento di DNA, la polimerasi, i reagenti necessari per l'amplificazione e una biglia di supporto. Sottoposti a delle variazioni cicliche di temperatura, come avviene in una normale reazione di PCR, i microreattori daranno luogo alla produzione di migliaia di frammenti clonali che, grazie a delle sequenze specifiche complementari a delle corte sequenze adese alle biglie, andranno a ricoprire l'intera superficie. Fig. 8 .

Il vantaggio rispetto alla PCR classica è quello di generare milioni di sequenze(reads) all'interno di una singola biglia, permettendo così di ottenere un'amplificazione del segnale di tipo clonale.

Il segnale di rilevamento iniziale è quindi di più facile interpretazione perché ne risulta amplificato in milioni di copie

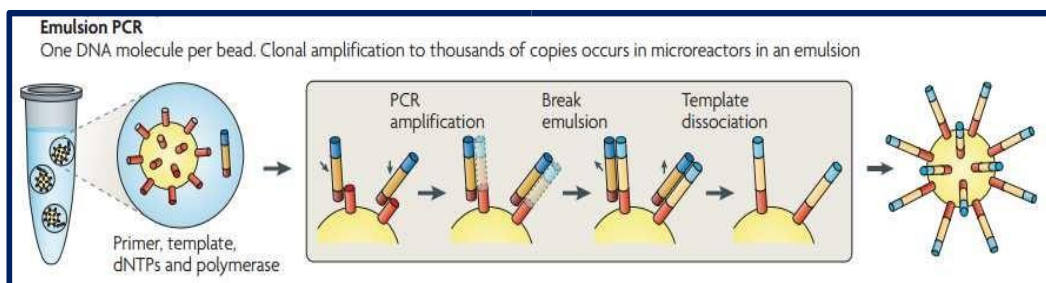


Fig 8 Schema Emulsion PCR (M. L. Metzker - Nature Review Genetics 2010)

3.5. Sequenziamento attraverso tecnologia Ion torrent

Il sequenziamento è avvenuto attraverso la piattaforma Ion Torrent, utilizzando il sequenziatore Ion genestudio S5 (ThermoFisher Scientific).

Ion torrent sfrutta il sequenziamento Whole genome per analizzare i

frammenti di cfDNA nell'intero genoma. Questa tecnologia si basa sull'impiego di chip semiconduttori in cui le variazioni di pH registrate in seguito all'incorporazione di un nucleotide nella catena nascente sono rilevate da un sensore e convertite in un dato bioinformatico.

Il cuore della tecnologia Ion Torrent è racchiusa nell'Ion Chip, nello specifico Ion 540, è costituito da uno strato superficiale superiore, in cui sono ricavati dei pozzetti appositamente strutturati per poter accogliere le biglie e i reagenti per il sequenziamento, ciascun pozzetto ha diametro di pochi micron, tale che in esso possa trovare spazio una sola biglia. Questo primo strato superficiale poggia su un secondo costituito da semiconduttori, che permette la trasmissione dei segnali allo strato ancora sottostante. Quest'ultimo è strutturato come una piastra di sensori, uno corrispondente a ciascun pozzetto, che hanno la capacità di registrare le piccolissime variazioni di pH che avvengono all'interno del pozzetto durante il sequenziamento, trasformandole in differenze di potenziale, ovvero in dati digitali.

Il processo di sequenziamento è caratterizzato da un susseguirsi ciclico sulla superficie del chip di lavaggi e flussi (flows) di soluzioni, contenenti ciascuno dei quattro diversi nucleotidi. In questo modo, quando viene dispensato il nucleotide complementare alla prima base libera sul frammento stampo, esso è incorporato alla sequenza nascente. Poiché la biglia, su cui è avvenuta l'amplificazione clonale, presenta sulla propria superficie frammenti tutti uguali, il legame della nuova base si verifica contemporaneamente su

migliaia di frammenti. La formazione di ogni nuovo legame fosfodiesterico determina l'idrolisi del gruppo trifosfato del nucleotide entrante con la liberazione netta di un protone (H^+). Il rilascio dei protoni causa l'abbassamento del pH della soluzione presente all'interno del pozzetto; questa variazione viene trasmessa e registrata dal sensore sottostante e digitalizzata.

Durante ciascun flow, la variazione di pH registrata è direttamente proporzionale al numero delle basi incorporate nella sequenza nascente. L'intensità della variazione di potenziale registrata è tanto superiore quante più sono le basi identiche consecutive.

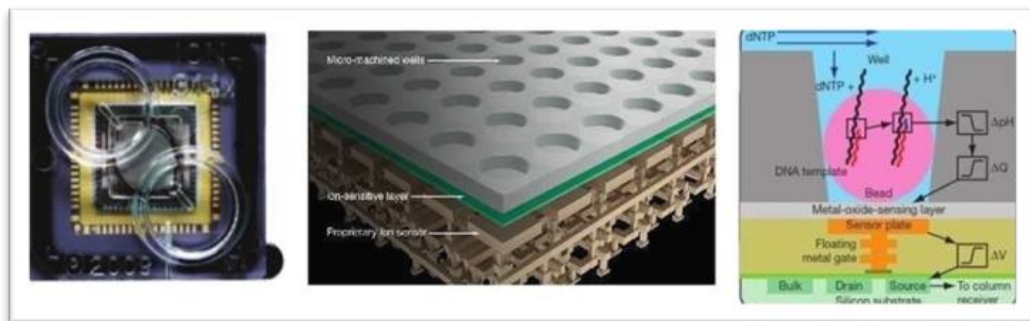


Fig. 9 Particolari dell'Ion Chip. Nell'immagine centrale, sezione del Chip con evidenti i pozzetti superficiali. A destra, schema del processo di rilevazione del segnale.

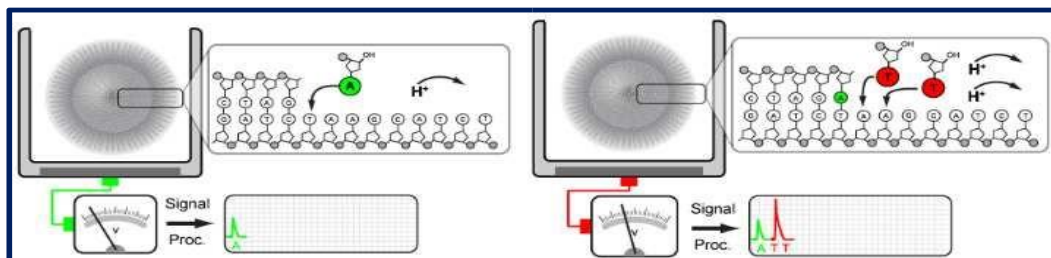


Fig. 10 Schema di sequenziamento nell'Ion Chip

La prima fase del sequenziamento è l'inizializzazione, lo strumento automaticamente effettua dei lavaggi per la pulizia delle condutture interne e porta a pH ottimale (7.75) le soluzioni che intervengono nel sequenziamento. Poiché tutta la tecnologia è basata sulla misura di minime variazioni di pH, questa fase di inizializzazione è un processo delicato, che richiede la massima cura nella preparazione delle soluzioni di partenza, e da cui dipende il buon esito della corsa.

3.6 Calcolo frazione fetale

La frazione fetale (FF), cioè la quantità di cfDNA fetale rilevata nel campione di plasma analizzato rispetto al cfDNA totale, è un parametro importante da determinare con l'esecuzione dei test NIPT, in quanto a frazioni fetali molto basse, le aneuploidie potrebbero non essere rilevabili, e quindi produrre risultati falsi negativi.

E' noto che l'età gestazionale e il peso corporeo della madre influenzano la % di frazione fetale; frazioni fetali < 4% determinano un drastico calo della sensibilità.

Ci sono diversi metodi per il calcolo della frazione fetale; la più conveniente misurazione della frazione fetale si basa sulla presenza del cromosoma Y nel campione di plasma, ma questo metodo è applicabile solo a feti maschili. L'altro metodo valuta le differenze di SNP tra madre e feto ma richiede test aggiuntivi e risulta quindi estremamente costoso.

Il terzo metodo utilizzato nel calcolo della frazione fetale, si basa sul principio che i frammenti del DNA del feto sono più corti rispetto ai frammenti del DNA materno

3.7 Analisi bioinformatica delle anomalie strutturali e numeriche

Le reads grezze sono state demultiplexate e allineate all'NCBI GRCh37 (genoma umano di riferimento) da parte del server Ion Torrent (TMAP aligner).

Successivamente le reads sono state filtrate a MAPQUALITY >30 dall'algoritmo WisecondorX.

Si sono sviluppati molti software per l'analisi dei dati per WGS. Questi sono comunemente indicati come metodi di profondità di copertura (DOC). L'algoritmo WISECONDOR, Within Sample COpy Number aberration DetectOR ha segnato una nuova era nello screening prenatale, si basa sul presupposto che la maggior parte del genoma non sia aberrato, pertanto non è possibile eseguire un confronto all'interno del campione se la maggior parte del genoma è aberrante, come nei casi di triploidia, infatti la mancanza di confronto è segnalata come anomalo.

Il vantaggio principale dell'algoritmo WisecondorX è che rileva piccole alterazioni utilizzando NGS anche a bassa copertura, infatti la maggiore risoluzione di rilevamento si ottiene confrontando conteggi di lettura all'interno del campione testato di ciascuna regione genomica con regioni su

altri cromosomi che si comportano in modo simile nei campioni di controllo. Questo confronto all'interno del campione evita la necessità di ri-sequenziare i campioni di controllo.

L'algoritmo lavora in tre step:

- 1) Conversione read dal formato bam a npz (sia per i campioni di riferimento che per quelli di prova)
- 2) Generazione baseline; l'algoritmo WisecondorX ha generato la baseline utilizzando gli 86 campioni negativi.
- 3) Predizione delle alterazioni.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi delle sequenze ottenute

Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante l'algoritmo fastQC per determinarne la qualità. Una qualità elevata ci assicura di ottenere una baseline più solida. La baseline verrà utilizzata dall'algoritmo WisecondorX per calcolare le anomalie cromosomiche, sia strutturali (duplicazioni e microdelezioni), che numeriche degli autosomi (trisomie 13, 18, 21) e cromosomi sessuali (sindrome di Turner, Klinefelter e Jacobs) FastQC genera un file con l'analisi per ogni input .bam. Per rendere più semplice l'analisi dei dati i file ottenuti dall'algoritmo fastQC sono stati aggregati utilizzando un altro software (multiQC) che genera un report aggregato.

L'algoritmo analizza e dà informazioni sul livello relativo di duplicazione trovato per ogni sequenza (bp), il contenuto medio delle basi GC (%), la lunghezza media dei frammenti (bp) e le reads ottenute.

Il primo step è quello di analizzare la lunghezza dei frammenti ottenuti. Dal grafico riportato in Fig. 12, è possibile verificare che i frammenti ottenuti sono in media di 150 bp. Questo è in linea con quello che ci si aspettava essendo un sequenziamento whole-genome del cfDNA circolante fetale. Un'altra utile informazione è il numero di reads ottenute, sempre dalla figura 12 è possibile notare che la maggior parte dei campioni si attesta tra 3 e 5 milioni di reads.

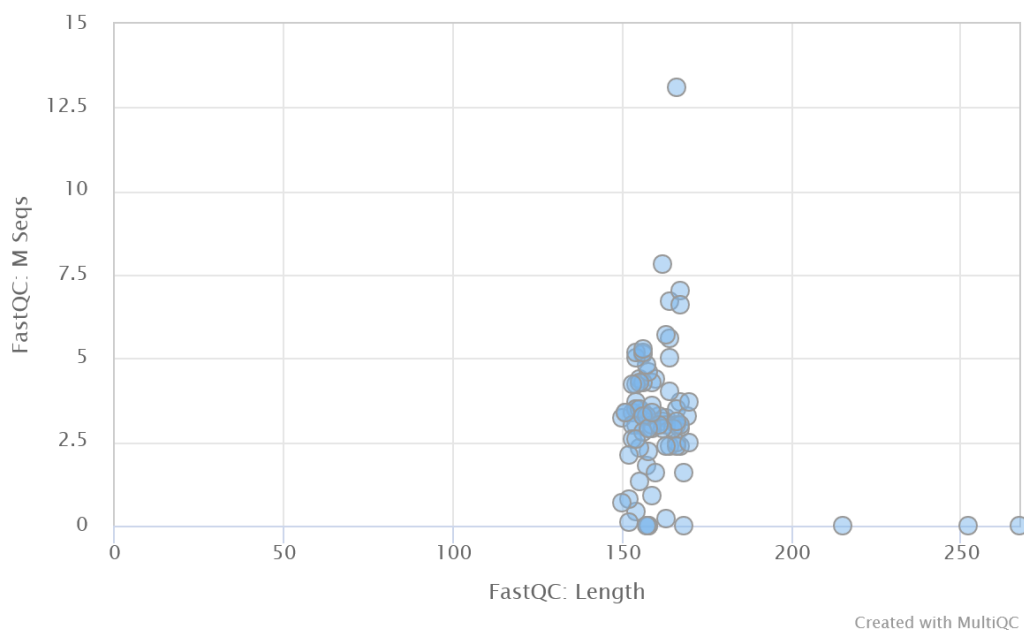


Fig. 12 Relazione tra la lunghezza delle reads (asse x) e la quantità (asse y)

Aumentando il numero di reads aumentano anche le sequenze duplicate, come evidenziato nella figura 13. Per ridurre il numero è importante quantificare in maniera accurata le librerie utilizzate per il sequenziamento. Un numero elevato di sequenze duplicate possono influire negativamente sulle successive analisi. Dalla nostra analisi di sequenziamento si ha un basso livello di duplicazione, la media delle sequenze duplicate è di 6,15% indicando così un livello molto alto di copertura delle sequenze.

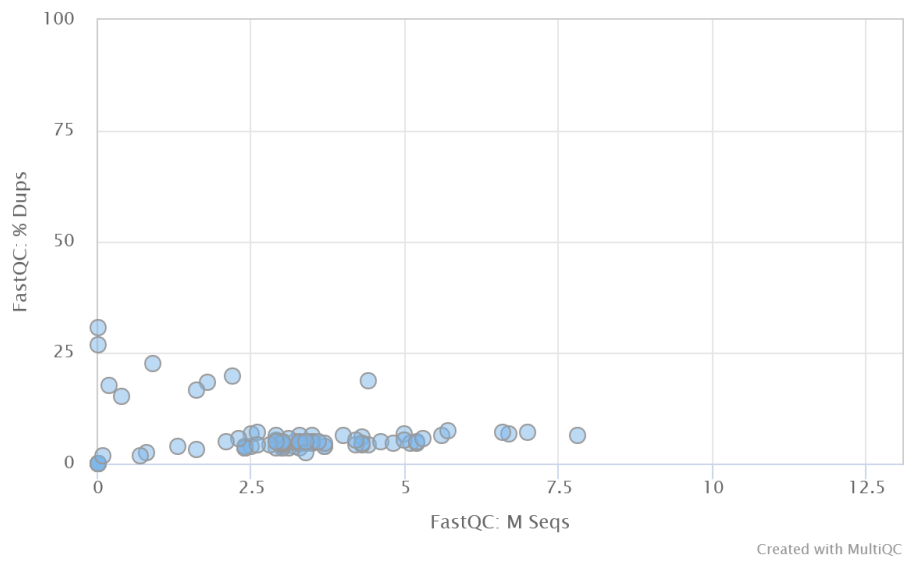


Fig. 13 Livello delle sequenze duplicate (asse y) all'aumentare delle reads (asse X).

Il grafico in Fig. 14 presenta il numero totale di reads facendo distinzione tra reads uniche (93,85%) e reads duplicate (6,15%).

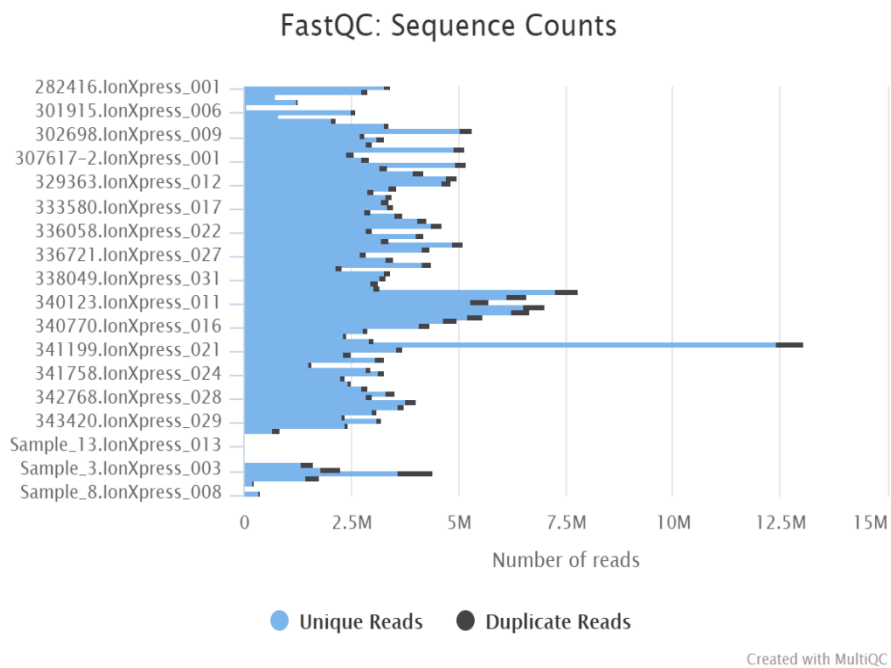


Fig.14 Sequenze uniche (azzurro) e duplicate (nero).

Il FASTQC ha valutato anche la qualità del sequenziamento, il plot non è stato generato dal software stesso, ma ha comunque riportato il quality value; le sequenze ottenute hanno un quality value intorno a 40.

Calcolo della frazione fetale

L'analisi della frazione fetale è stata eseguita mediante il software seqFF. Dalla fig. 15 si nota che i frammenti di cfDNA fetale sono più corti del cfDNA materno. La figura 15 mostra la distribuzione della lunghezza delle reads di tre campioni con una frazione fetale diversa, il campione con frazione fetale più alta 19% (linea nera) ha un numero di reads maggiore rispetto agli altri nelle regioni più corte che hanno valori più bassi, rispettivamente del 3% e 10%, infatti il cfDNA materno ha una lunghezza di 166bp. (Jiping Shi, Runling Zhang, Jinming Li, and Rui Zhang 2020)

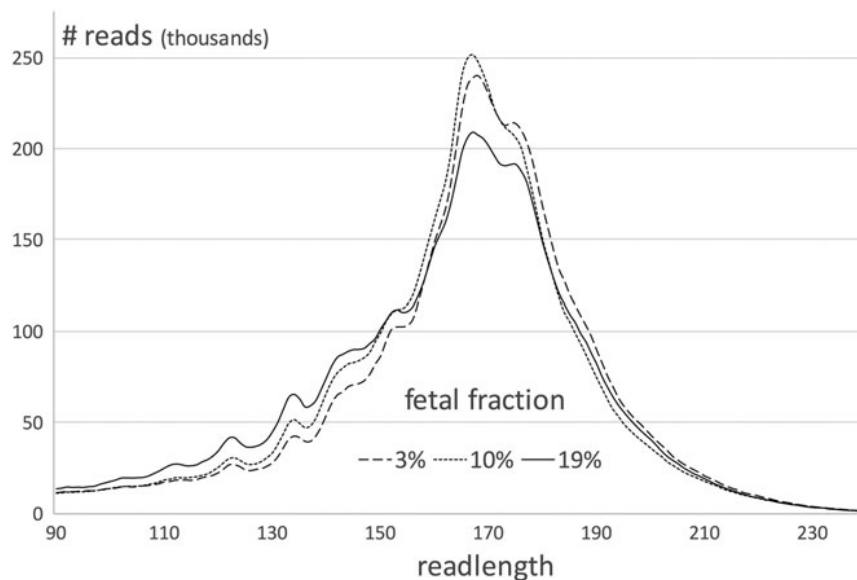


Fig. 15 Grafico che mostra la lunghezza del cfDNA (19%)

Questo metodo mette in relazione la lunghezza dei frammenti materni con quelli fetali. Il valore della frazione fetale riveste un'enorme importanza poiché frazioni fetali troppo basse possono portare a risultati errati (falsi negativi).

I valori ottenuti dalla frazione fetale sono stati messi in relazione con il BMI. Frazioni fetali $< 4\%$ sono presenti in donne con un BMI superiore a 25 (inizio di obesità).

Un caso limite è stato rappresentato da una signora obesa con un BMI di 35. Alla signora è stato ripetuto il prelievo ma la concentrazione fetale è risultata quasi assente e le è stato consigliato di ricorrere ad un'altra procedura diagnostica, amniocentesi o villocentesi. Gli altri campioni utilizzati nella nostra analisi, hanno frazione fetale compresa tra 4 e 17. Come è possibile verificare dalla Fig. 16, una bassa frazione fetale corrisponde ad un BMI alto, più è alto il BMI più la frazione fetale si abbassa.

Nel nostro studio 6 sono le donne obese, aventi frazioni fetali: 4%, 4%, 5%, 9%, 12%, 7% con una media del 6,8%, contro la media dei campioni totali che è del 9,17%, quindi si può affermare della relazione inversamente proporzionale tra indice di massa corporea e frazione fetale. Tra le donne obese è stato chiesto a una di loro ripetere il prelievo due settimane dopo (13 settimana gestazionale), perché risultava inferiore al 4%

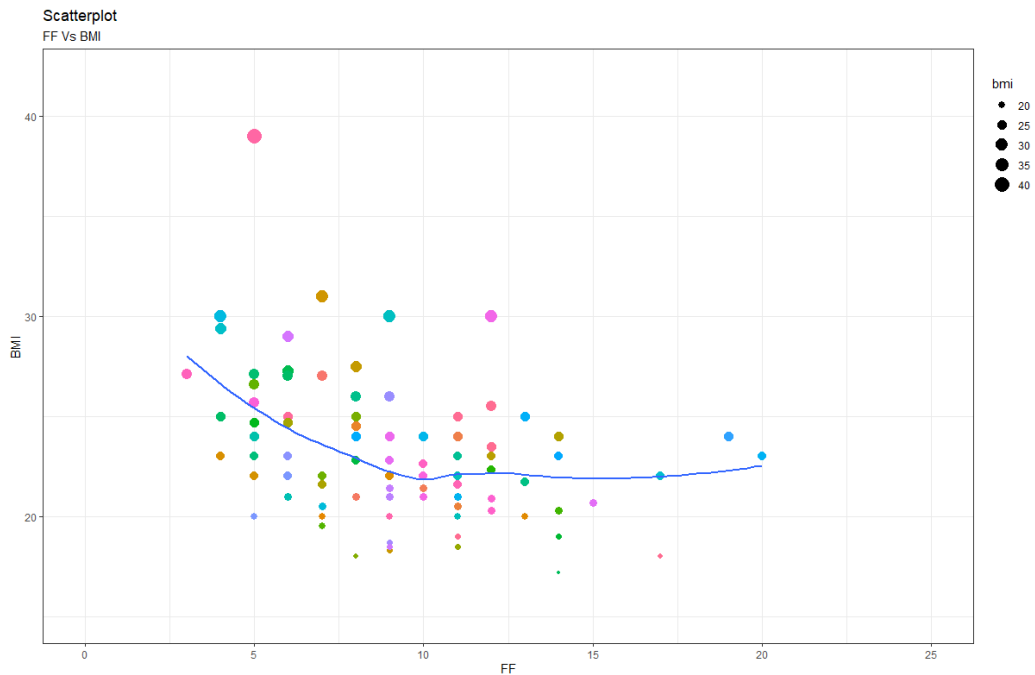


Fig. 16 Il grafico a dispersione mostra la distribuzione delle cellule fetali in 86 donne in gravidanza.

Oltre all'indice di massa corporea, è stato valutato anche il parametro dell'età gestazionale rispetto alla % di Frazione Fetale. Come si evince nel grafico di Fig 17, la frazione fetale aumenta con l'età gestazionale

Per quanto riguarda gli altri parametri: età della donna, diabete, pazienti sottoposte a PMA, fumatrici e donne in terapia di anticoagulanti non si è verificata correlazione con la % della frazione fetale

Dall'analisi non sono stati ottenuti valori molto alti che potessero giustificare una particolare patologia gestazionale (come la preeclampsia)

Quindi si può affermare che la frazione fetale aumenta con l'età gestazionale ed è negativamente correlata con il peso materno.

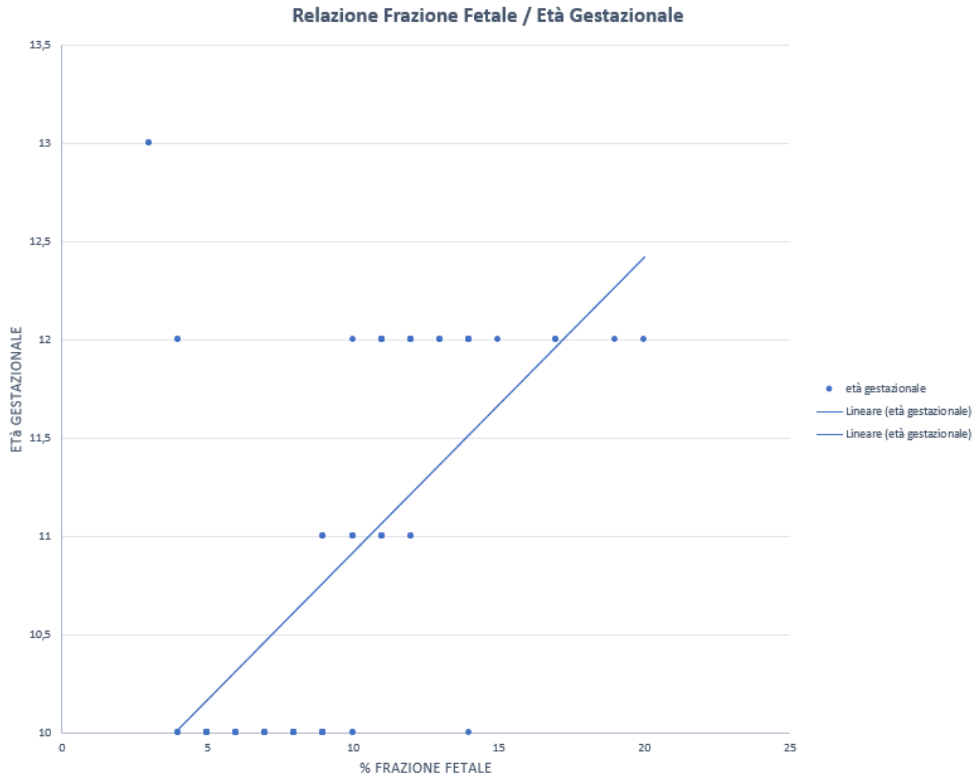


Fig 17 Il grafico mostra la correlazione tra % di Frazione fetale ed età gestazionale

Generazione della baseline

Tramite l'algoritmo WisecondorX abbiamo generato la baseline come riportato in fig. 18.

Poiché sWGS non copre mai interamente il genoma, una sequenza di riferimento è divisa in finestre o bin che mostrano la proprietà della copertura dell'intero genoma. Una considerazione importante è la dimensione riguardo i bin: più sono grandi, più letture manterranno e meno "rumore" verrà visualizzato dall'output complessivo. Tuttavia, l'utilizzo di bin più grandi

determina una penalità, in termini di ridotta risoluzione risultante. Ogni punto rappresenta un bin; i punti vanno attraverso l'asse X dal cromosoma 1 a X (o Y, nel caso di un maschio). Il rapporto tra il numero osservato di reads e il numero previsto di reads rappresenta lo stato "normale".

Poiché questi valori vengono trasformati in \log_2 , i punti neutri della copia dovrebbero essere vicini a 0, mentre in caso di aneuploidia il rapporto è diverso da zero. La dimensione dei punti rappresenta la variabilità al set di riferimento; quindi, la dimensione aumenta con la certezza di un'osservazione; lo stesso vale per la larghezza della linea dei segmenti. Le barre grigie verticali rappresentano la blacklist che corrisponde principalmente a loci e ripetizioni ipervariabili. Infine, le linee tratteggiate colorate orizzontali mostrano dove sono attesi gli stati costituzionali $1n$ e $3n$ (quando il DNA costituzionale è al 100% di purezza). Spesso, un'aberrazione non raggiunge questi limiti, il che ha diverse potenziali cause: a seconda del tipo di analisi, il campione potrebbe essere soggetto a frazione tumorale, frazione fetale, mosaicismo, ... ecc. A volte, i segmenti superano questi limiti e quindi è probabile che si abbia a che fare con $0n$, $4n$, $5n$, $6n$, ...

La qualità dell'analisi NIPT dipende dalla quantità e quantità del cfDNA. La quantità ottimale di cfDNA non deve essere inferiore al 4% e dipende, oltre che dall'età gestazionale, anche dall'indice di massa corporea.

Nel nostro studio abbiamo ottimizzato l'analisi del cfDNA tramite un protocollo alternativo e più economico rispetto a quello attualmente utilizzato. La nostra baseline, creata dall'analisi del cfDNA di 86 campioni, permette indagare aneuploidie dell'intero corredo cromosomico.

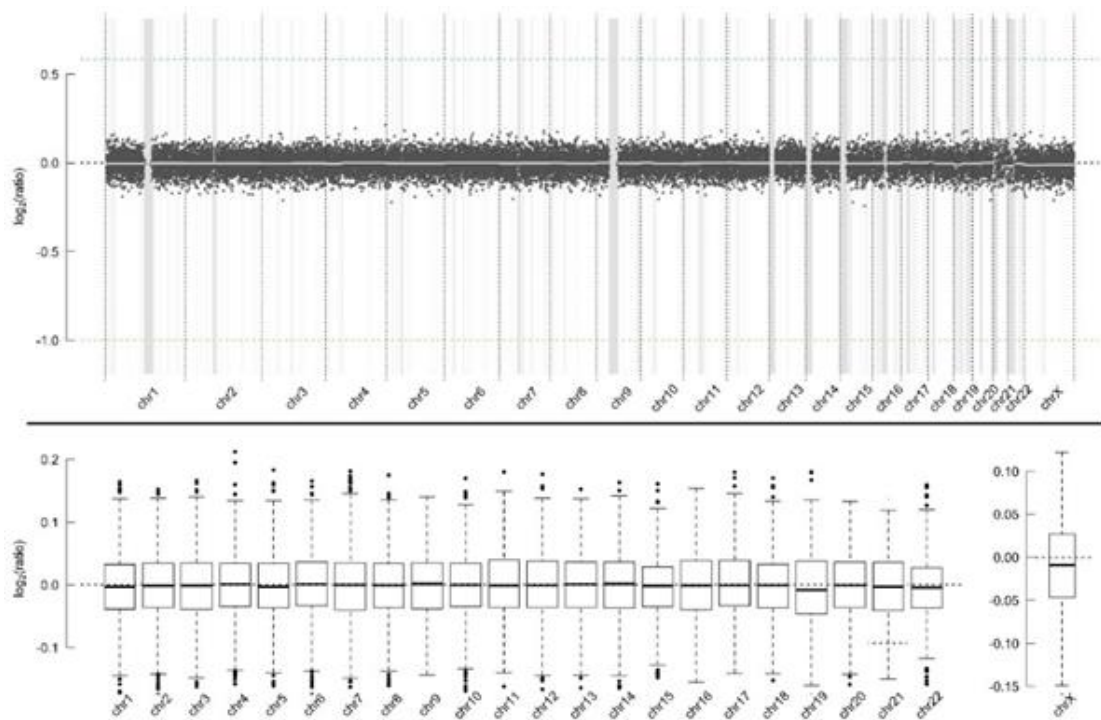


Fig. 18 Grafico che descrive l'algoritmo di WisecondorX di un cariotipo euploide

5. CONCLUSIONI

La tecnologia Next Generation Sequencing ha determinato un profondo cambiamento nella metodologia di sequenziamento degli acidi nucleici, favorendo lo sviluppo di nuove procedure di indagine clinica in molti settori della genetica molecolare, tra cui la diagnosi prenatale.

Dalla scoperta del cell free DNA (1948) ad oggi sono stati fatti passi da gigante nella valutazione di anomalie cromosomiche

L'obiettivo prefissato è stato raggiunto: ottenere una propria pipeline per la diagnosi di aneuploidie strutturali e numeriche attraverso la tecnologia Ion torrent, coadiuvato dall'algoritmo WisecondorX. Tale algoritmo infatti riesce a rilevare aberrazioni anche a coverage non ottimali.

La tecnologia Ion torrent fa conseguire risultati migliori rispetto ai comuni test di screening e a costi più contenuti rispetto alla tecnologia Illumina.

Inoltre la valutazione del cfDNA potrebbe essere sfruttata nella diagnosi preventiva (antecedente ai sintomi clinici) di patologie legate allo stato di gravidanza. E' stata ampiamente documentata la relazione tra preeclampsia e rilascio di cfDNA (ben 5 volte di più rispetto ad uno stato non patologico).

E' una malattia gestazionale abbastanza frequente, infatti il 5% delle donne ne risulta affetto (Yi Wu, Ana Werlang 2018). Altre rilevanti alterazioni funzionali come l'aumento di rischio di gravidanza pretermine e ritardo di crescita intrauterino, sono connesse all'aumento dell'apoptosi del trofoblasto e quindi al rilascio maggiore di cfDNA.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Nicholas M. LeFevre, Richard L. Sundermeyer Fetal aneuploidy: screening and diagnostic testing *Journal of medical screening* (2020)
- 2 Amina P. Alio 1, Hamisu M. Salihu, Jennifer L Kornosky, Alice M. Richman, Phillip J Marty Feto-infant health and survival: does paternal involvement matter? *Matern Child Health J* (2010)
- 3 Aditi Jindal, Chitra Chaudhary Amniocentesis *All India Institute Of Medical Sciences* (2021)
- 4 Imran Rafi, Melissa Hill, Judith Hayward, Lyn S Chitty. Non-invasive prenatal testing: use of cell-free fetal DNA in Down syndrome screening *British Journal of General Practice* (2017)
- 5 Paulo Vinicios Camuzi Zovico, Victor Hugo Gasparini Neto. Cell-free DNA as an obesity biomarker. *Physiological Research* (2020)
- 6 Maeve K. Hopkins, Nathanael Koelper, Samantha Caldwell Brittany Dyr, Lorraine Dugoff Obesity and no call results: optimal timing of cell-free DNA testing and

redraw *American journal of obstetrics and gynecology*
(2021)

- 7 Luigi Carbone , Federica Cariati, Laura Sarno, Alessandro Conforti, Francesca Bagnulo , Ida Strina , Lucio Pastore , Giuseppe Maria Maruotti, Carlo Alviggi Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges *Genes* (2020)
- 8 Yi Wu, Ana Werlang , Weiwei Cheng, Andrea Lanes, Shi Wu Wen, Mark Walker, Association between Levels of Total Cell-Free DNA and Development of Preeclampsia- A Literature Review *AJP Rep* (2021)
- 9 Jian-Yong Shao, Yu-Hong Li, Hong-Yi Gao, Qiu-Liang Wu, Nian-Ji Cui, Li Zhang, Gang Cheng, Li-Fu Hu, Ingemar Ernberg, Yi-Xin Zeng Comparison of Epstein-Barr virus DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma *Anticancer research* (2004)
- 10 Olfat M. Hendya, Tawfik Abdel Motalibb, Mona A. El Shafiee, Fatma A. Khala fdSobhy, E. Kotbe, Aziza Khalilf, Salwa R. Alig Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus severity and

- monitoring of therapy *Egyptian Journal of Medical Human Genetics (2016)*
- 11 Teppei Hashimoto, Kohsuke Yoshida, Akira Hashiramoto, Kiyoshi Matsui Cell-Free DNA in Rheumatoid Arthritis *International journal of molecular sciences (2021)*
- 12 Stephanie C Y Yu , Shara W Y Lee, Peiyong Jiang, Tak Y Leung, K C Allen Chan, Rossa W K Chiu, Y M Dennis Lo High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing *Clinical chemistry (2013)*
- 13 Jonatan Blais, Sylvie Giroux, André Caron, Valérie Clément, François Rousseau Development of Reference Materials for Noninvasive Prenatal Aneuploidy Testing by Massively Parallel Sequencing: *A Proof-of-Concept Study The journal of applied laboratory medicine (2019)*
- 14 Lisheng Liu, Hua Li, Ning Wang, Xingguo Song, Ke Zhao, Cong Zhang Hypertension research *official journal of the Japanese Society of Hypertension (2021)*
- 15 Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W GRedman, James

- S Wainscoat Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum *The lancet (1997)*
- 16 Stanislav Volik, Miguel Alcaide, Ryan D. Morin, and Colin Collins Cell-free DNA (cfDNA):Clinical significance and utility in cancer shaped by emerging *Technologies July (2016)*
- 17 W Wang, M Liang, G Ma, L Li, W Zhou, T Xia, H Xie, S Wang Plasma cell-free DNA integrity plus circulating tumor cells: a potential biomarker of no distant metastasis breast cancer *Neoplasma (2017)*
- 18 Ji Hyae Lim, Bom Yi Lee, Jin Woo Kim, You Jung Han, Jin Hoon Chung, Min Hyung Kim, Dong Wook Kwak, So Yeon Park, Hee Back Choi, Hyun Mee Ryu Evaluation of extraction methods for methylated cell-free fetal DNA from maternal plasma *Journal of assisted reproduction and genetics (2018)*
- 19 Sung K. Kim, Gregory Hannum, Jennifer Geis, John Tynan, Grant Hogg, Chen Zhao, Taylor J. Jensen, Amin R. Mazloom, Paul Oeth, Mathias Ehrich, Dirk van den Boom and Cosmin Deciu Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts *Prenatal Diagnosis (2015)*

- 20 Sofie Kruckow, Palle Schelde, Lotte Hatt, Katarina Ravn, Olav Bjørn Petersen, Niels Ulbjerg, Ida Vogel, Ripudaman Singhw, 2019, Does Maternal Body Mass Index Affect the Quantity of Circulating Fetal Cells Available to Use for Cell-Based Noninvasive Prenatal Test in High-Risk Pregnancies? *Fetal diagnosis and therapy (2019)*
- 21 Ashwin Agarwal, Lauren C Sayres, Mildred K Cho, Robert Cook-Deegan, Subhashini Chandrasekharan Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States *Prenatal Diagnosis (2013)*
- 22 Sasimol Udomruk Santhasiri Orrapin Dumnoensun Pruksakorn Parunya Chaiyawat Size distribution of cell-free DNA in oncology *Critical reviews in oncology/hematology (2021)*
- 23 Jiping Shi, Runling Zhang, Jinming Li, and Rui Zhang Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing *Theranostics (2020)*

- 24 Yi Wu, Ana Werlang Association between Levels of Total Cell-Free DNA and Development of Preeclampsia—A Literature Review *Canadian Institutes of Health Research (2018)*
- 25 Taiki Watanabe, Shuhei Takada, Ryushin Mizuta Cell-free DNA in blood circulation is generated by DNase1L3 and caspase-activated DNase *Biochemical and biophysical research communications (2019)*
- 26 Dana W.Y. Tsui, Rossa W.K. Chiu, and Y.M. Dennis Lo Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma *Chimerism 2010*