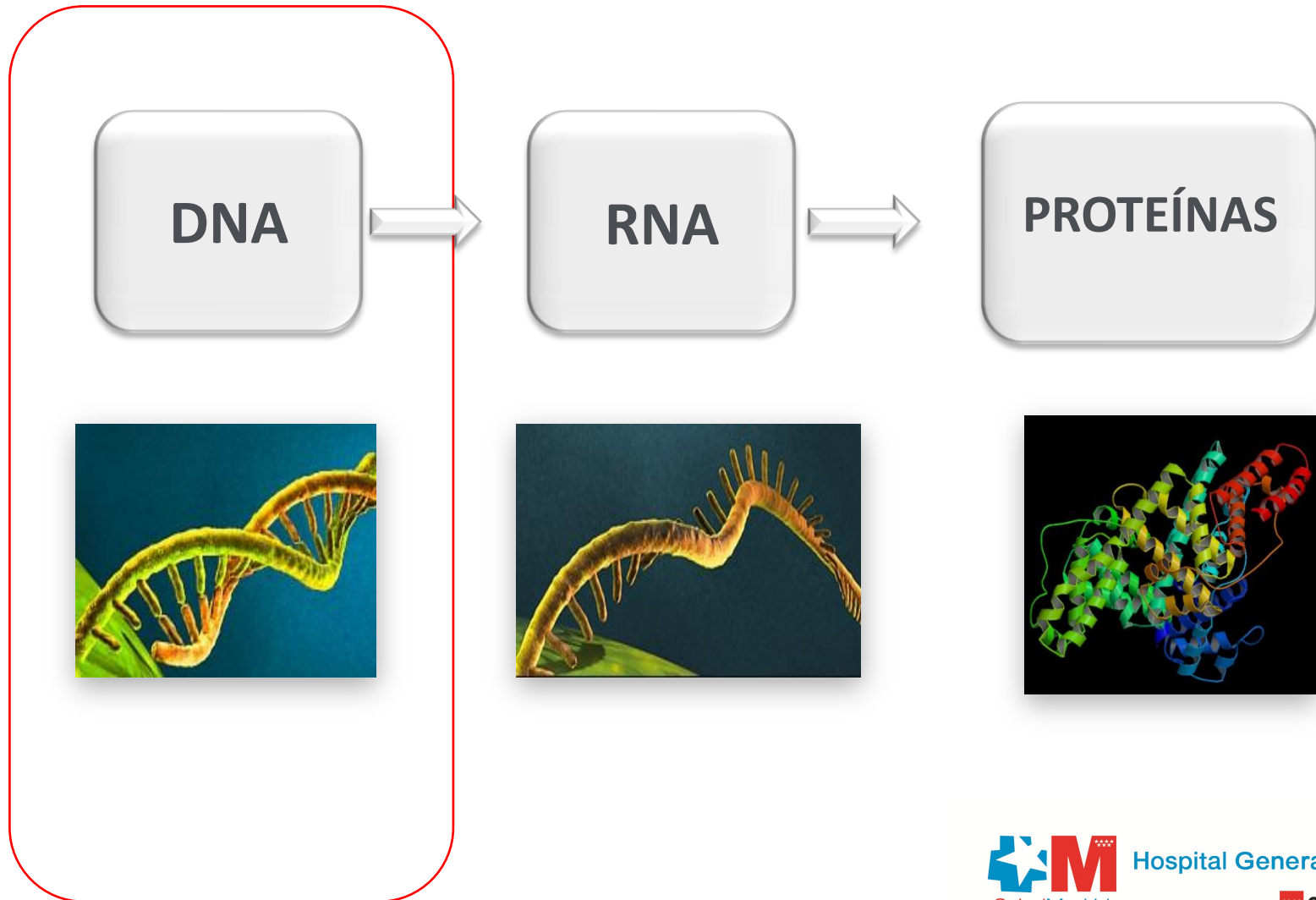


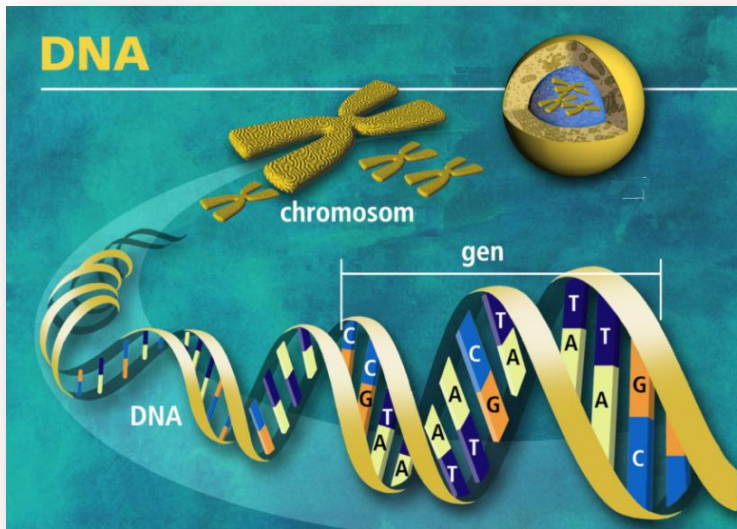


DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

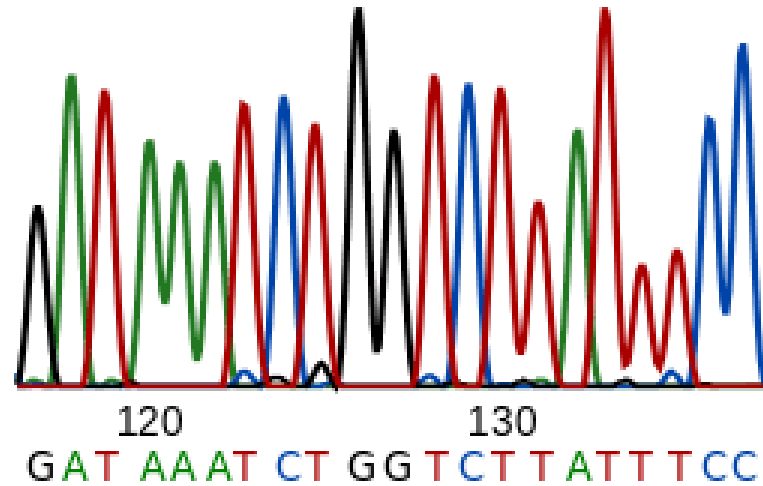




¿QUÉ SIGNIFICA SECUENCIAR EL ADN?



“Lectura del ADN”



Adenina

Guanina

Timina

Citosina



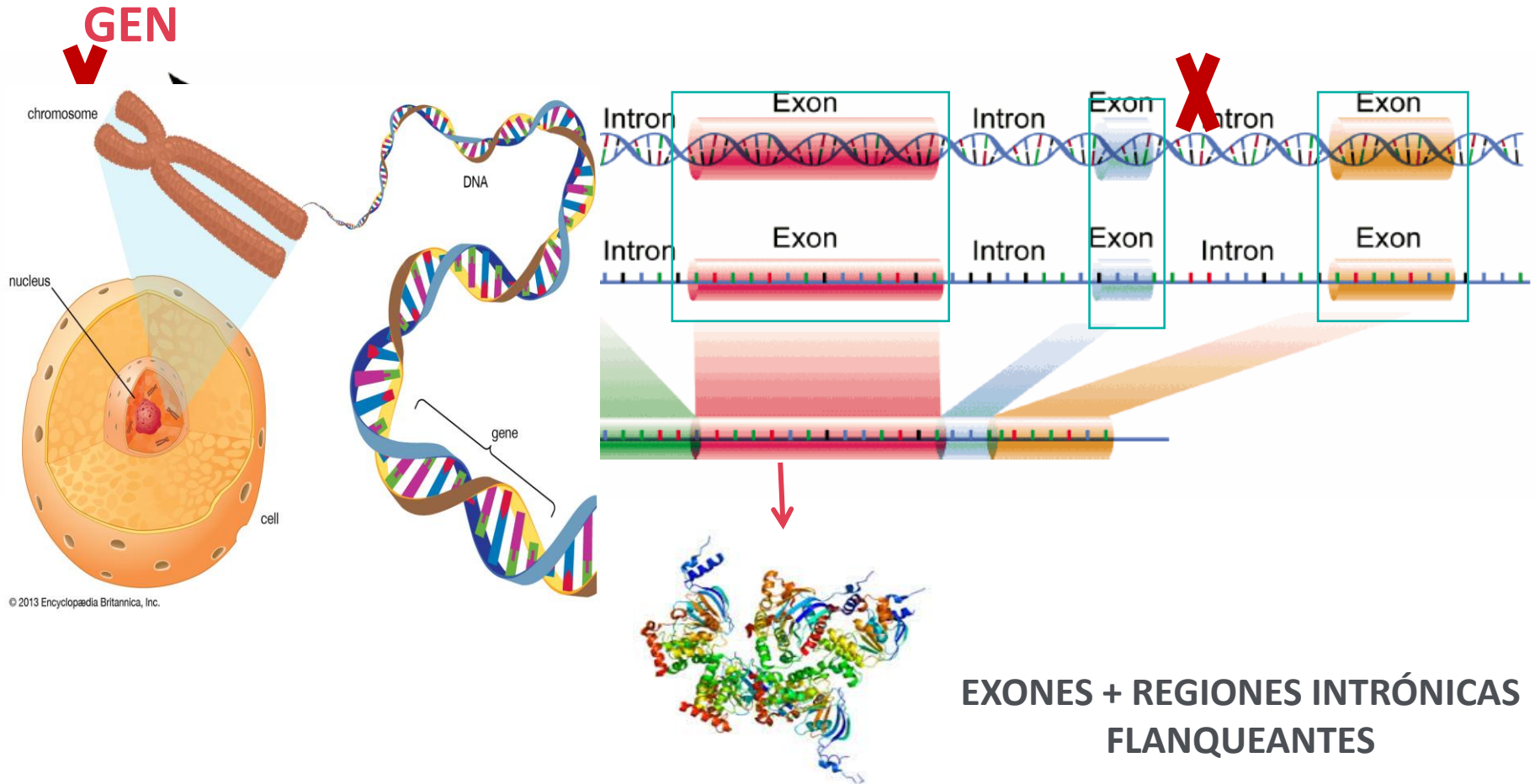
Hospital General de Villalba

SaludMadrid

Comunidad de Madrid



¿Qué estudiamos mediante secuenciación?



© 2013 Encyclopædia Britannica, Inc.



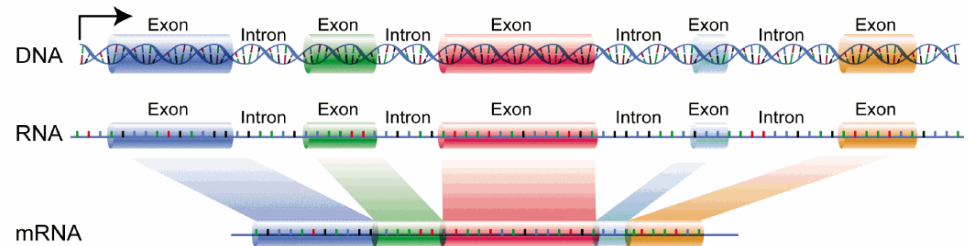
NOMENCLATURA DE LAS VARIANTES

DNA

g.31162G>C
NG_032806.1

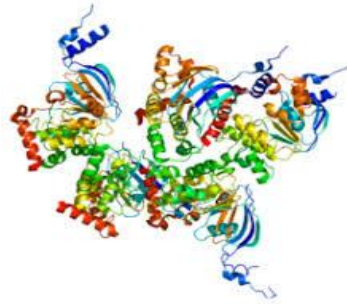
cDNA

c.1473G>C
Exón 11
NM_025009.4



PROTEÍNA

p.Lys491Asn
NP_079285.2





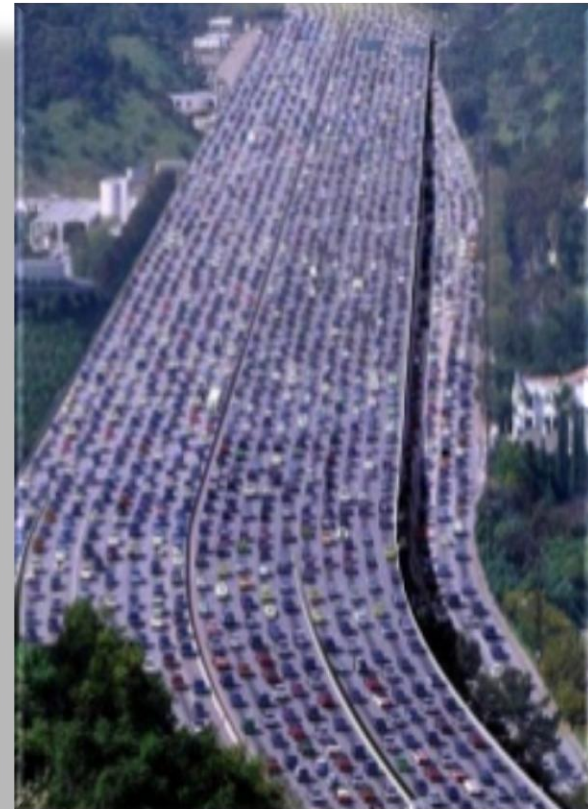
ABORDAJE DEL ESTUDIO

DIRIGIDO



SECUENCIACIÓN SANGER

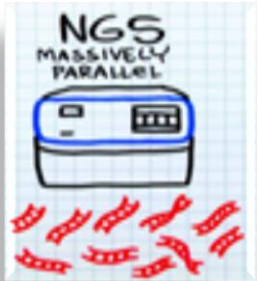
MENOS DIRIGIDO



SECUENCIACIÓN NGS



Ejemplo de un secuenciador: NextSeq



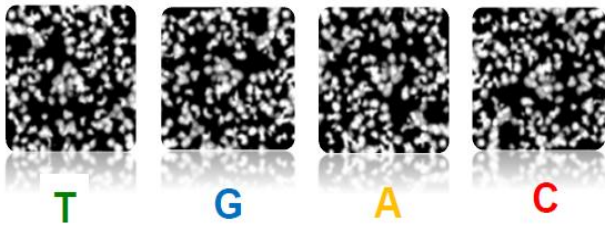
12 cm

97 cm



NGS: ANÁLISIS DE DATOS

1. OBTENCIÓN SECUENCIAS

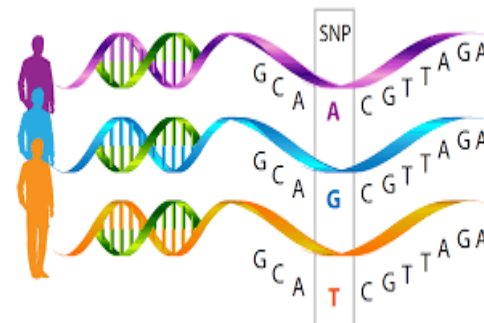


2. ALINEAMIENTO

Genoma de Referencia



3. LLAMADA Y ANOTACIÓN DE VARIANTES (NOMENCLATURA)



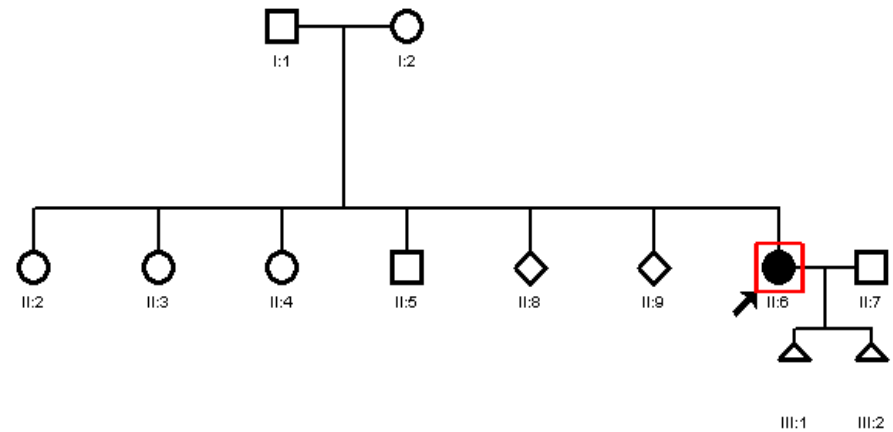
4. CLASIFICACIÓN Y CATEGORIZACIÓN VARIANTES. INFORMES



¿QUÉ CASOS ESTUDIAR POR NGS Y A QUIÉN?

• Enfermedades heterogéneas

- Epilepsias
- Neuropatías
- Distrofias musculares
- Cardiopatías
- Cáncer
- Discapacidad intelectual
- Sorderas
- Retinopatías
- etc



NO siempre es la primera aproximación para el estudio genético.

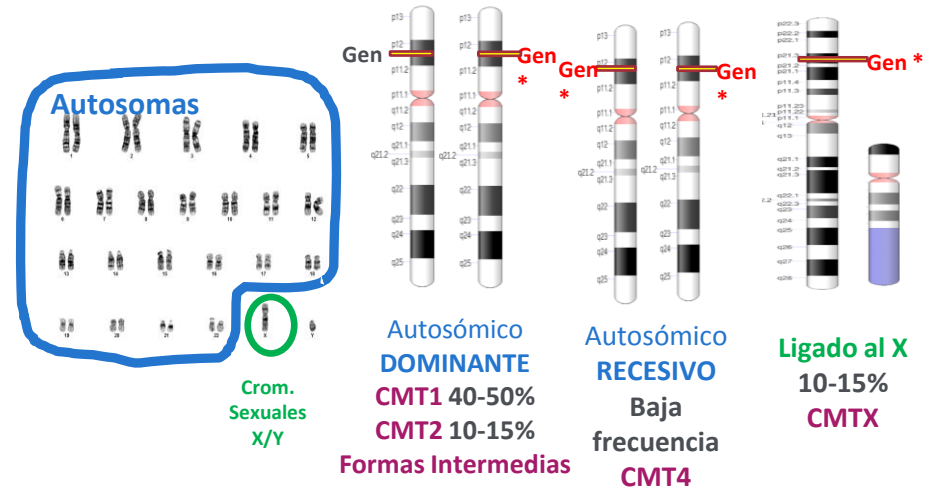
Valoración por servicio GENÉTICA.

Ejemplo: Charcot-Marie-Tooth

Neuropatía hereditaria sensitiva y motora

>60 genes asociados a CMT

Genes Implicados en la estructura y función del axón y/o mielina



Valoración por Servicio de Genética

- Clínica, historia familiar etc.



Algoritmo diagnóstico CMT (FJD)

- 1) Descartar CMT1A
(MLPA (duplicación /delecion PMP22): >50% de los casos)
- 2) Estudio del resto de genes asociados a CMT
NGS para >60 genes



APROXIMACIONES DIAGNÓSTICAS DE NGS

PANEL DE GENES (paneles reales)

Secuenciamos y analizamos los genes que están incluidos en el panel

No es posible estudiar otros genes

Mayor sensibilidad

EXOMA CLÍNICO (paneles virtuales)

Secuenciamos ~4700 genes asociados a enfermedad y filtramos por los genes de interés según sospecha clínica

Capacidad de reanalizar y estudiar más genes

Mayor número de variantes de significado clínico incierto y de hallazgos inesperados



INVESTIGACIÓN vs DIAGNÓSTICO

EXOMA COMPLETO
GENOMA COMPLETO

**INVESTIGACIÓN
GENÉTICA**



Validación
técnicas/paneles



EXOMA CLÍNICO
PANELES GENES

**DIAGNÓSTICO
GENÉTICO**



Casos no resueltos
Búsquedas de
nuevos genes





DIFICULTAD DE LA NGS

**Clasificación
variantes**

Literatura
científica

Programas
predicción

Bases de
datos

**INFORME de
UTILIDAD CLÍNICA**



**Detallada historia
clínica**



SECUENCIACIÓN NGS



CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD¹, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

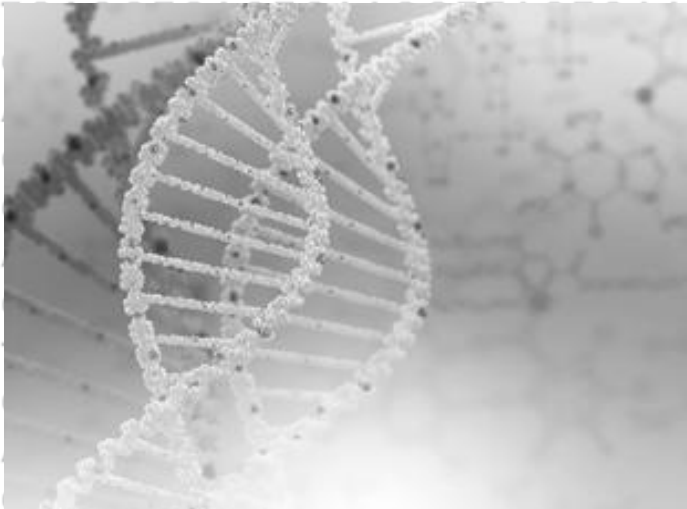
European Journal of Human Genetics (2016) 24, 2–5
© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved. 1018-4813/16
www.nature.com/ejhg

Policy

Guidelines for diagnostic next-generation sequencing

Gert Matthijs^{1,18}, Erika Souche^{1,8}, Mariëlle Alders², Aniek Corveleyn¹, Sebastian Eck³, Ilse Feenstra⁴, Valérie Race¹, Erik Sistermans⁵, Marc Sturm⁶, Marjan Weiss⁵, Helger Yntema⁴, Egbert Bakker⁷, Hans Scheffer⁴ and Peter Bauer⁹

AGTCAGGTCAGTCAAGCTTACTG
GGTCAGTCAAGCTTACTGCATCG



AGTCAGGTCAGTCAAGCTTACTG
CTTAAGTCAGGTCAGTCAAGCTG
GGTCAGTAGTCA CAAGCTTACTG
AGTCAGGTCAGTCAAGCTTACTG





SNVs (SNPs)

SNVs: variaciones en la secuencia de ADN de un nucleótido

GGTCAGTAGTCA CAAGCTTACTG **Paciente 1**
GGTCAGTAGTCT CAAGCTTACTG **Paciente 2**

>15,000,000 SNVs en el genoma humano
~ 3 – 4 millones SNVs por individuo



No se informan los SNVs (variantes benignas)
Sólo variantes con una frecuencia alélica baja (<3%)



¿Cómo clasificamos las variantes ?

1000 Genomes

dbSNP
Short Genetic Variations

ExAC Browser (Beta)

5 YEARS
10MIM
Human Genetics Knowledge
for the World

ClinVar

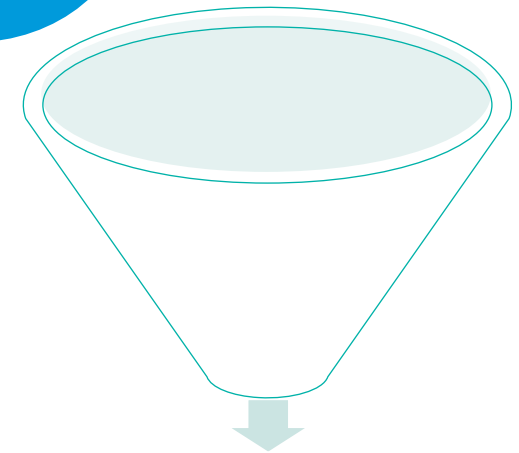
DECIPHER
GRCh37

HGMD[®]

LOVD
Leiden Open Variation Database
LOVD v.3.0 - Leiden Open Variation Database
Online gene-centered collection and display of DNA variations

Bases de
datos
poblacionales

Bases de
datos
clínicas



Clasificación/priorización
de las variantes



Bases de datos clínicas para consultar

5 YEARS OMIM
Human Genetics Knowledge for the World

OMIM®

Online Mendelian Inheritance in Man®

An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders
Updated November 17, 2017

Search OMIM for clinical features, phenotypes, genes, and more...

Advanced Search : [OMIM](#), [Clinical Synopses](#), [Gene Map](#)
Need help? : [Example Searches](#), [OMIM Search Help](#), [OMIM Tutorial](#)
Mirror site : [mirror.omim.org](#)

OMIM is supported by a grant from NHGRI, licensing fees, and generous contributions from people like you.

[Make a donation!](#)

GeneReviews®

Margaret P Adam, Editor-in-Chief; Senior Editors: Holly H Ardinger, Roberta A Pagon, and Stephanie E Wallace. Molecular Genetics: Lora JH Bean, Heather C Mefford, and Karen Stephens. Genetic Counseling: Anne Amemiya and Nikki Ledbetter.

Seattle (WA): [University of Washington, Seattle](#); 1993-2017.
ISSN: 2372-0697

[Copyright and Permissions](#)

[GeneReviews Advanced Search](#) [Help](#)

orphanet

El portal sobre enfermedades raras y medicamentos huérfanos

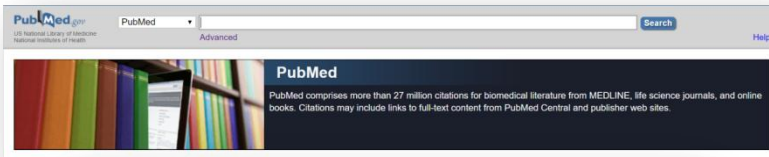
«Ninguna enfermedad es tan rara como para no merecer nuestra atención»

Nuestros servicios

<p>Inventario, clasificación y enciclopedia de enfermedades raras, con los genes implicados</p>	<p>Inventario de medicamentos huérfanos</p>	<p>Directorio de asociaciones de pacientes</p>	<p>Directorio de profesionales e instituciones</p>
<p>Directorio de centros/consultas expertos</p>	<p>Directorio de laboratorios clínicos que ofrecen pruebas diagnósticas para enfermedades raras</p>	<p>Directorio de proyectos, ensayos clínicos, registros y biobancos activos</p>	<p>Colección de informes temáticos, los Informes de Orphanet</p>

Buscar una enfermedad

¿Cómo clasificamos las variantes ?

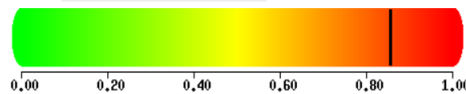


mutation t@sting

Human Splicing Finder



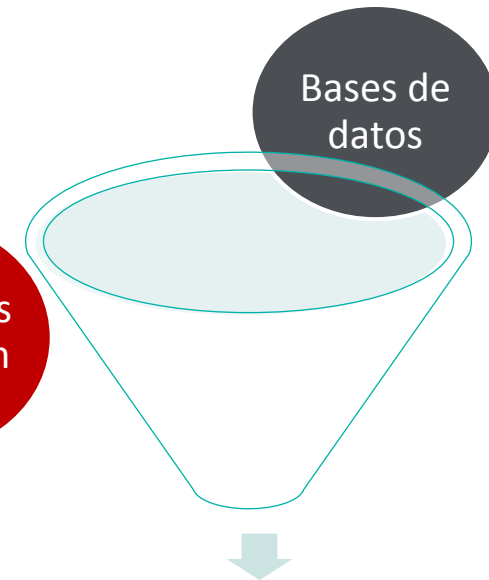
This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of 0.855 (sensitivity: 0.83; specificity: 0.93)



Literatura científica

Bases de datos

Programas predicción

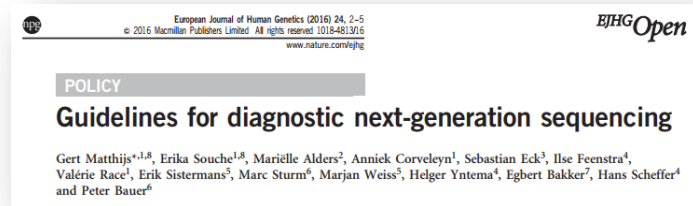


Clasificación/priorización de las variantes



Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD³, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹⁵ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee



AGTCAGGTCAGTCAAGCTTACTG
GGTCAGTCAAGCTTACTGCATCG



Detallada historia clínica

INFORME de UTILIDAD CLÍNICA

CTG
AG
CTG
CTG
GGTCAGTCAAGCTTACTG
AGTCAGGTCAGTCAAGCTTACTG



PANEL DE GENES (paneles reales)

Secuenciamos y analizamos los genes que están incluidos en el panel



Caso 1: **Cáncer de mama y ovario familiar**

EXOMA CLÍNICO (paneles virtuales)

Secuenciamos ~ 4700 genes asociados a enfermedad y filtramos los genes de interés según sospecha clínica



Caso 2: **Retraso madurativo con microcefalia**

Caso 1: Cáncer de mama y ovario familiar



Servicio de Genética



Motivo de consulta: Mujer de 34 años derivada de Oncología por Carcinoma ductal infiltrante.

Antecedentes familiares:

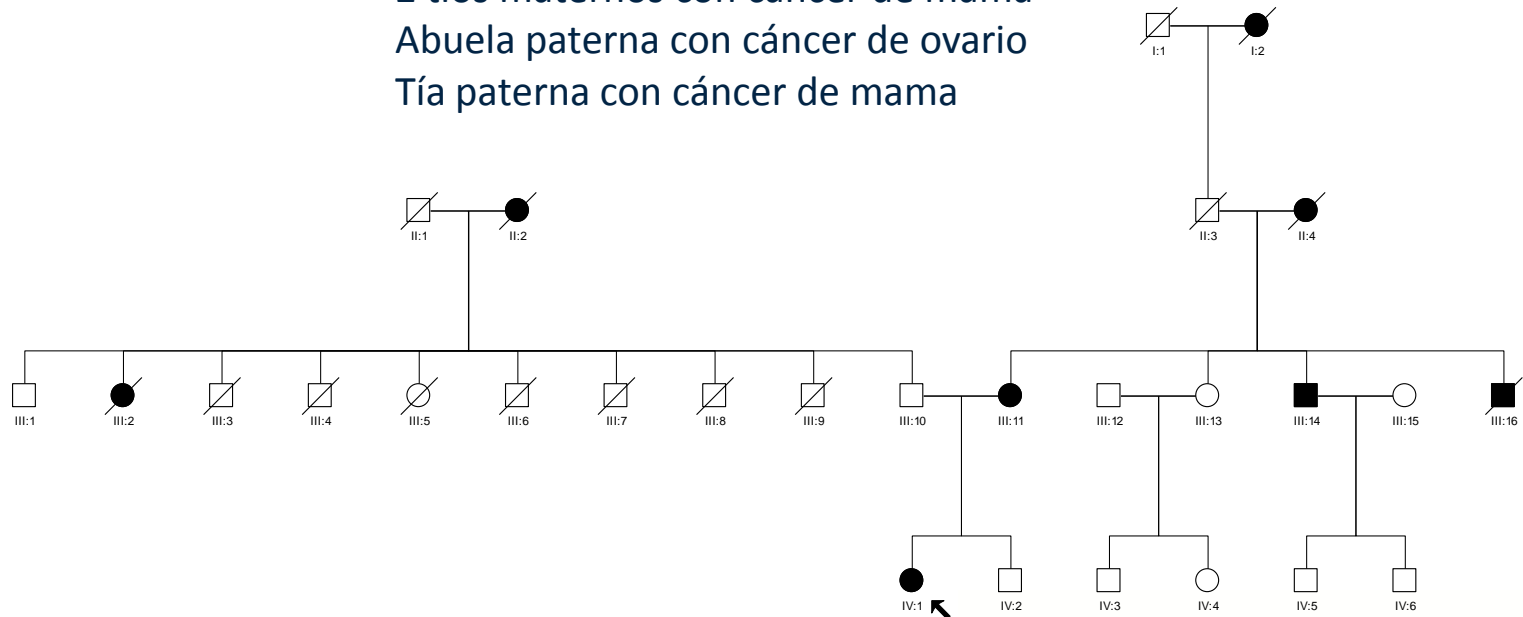
Madre cáncer de mama (dx a los 59)

Abuela materna cáncer de ovario (fallecida a los 59 años)

2 tíos maternos con cáncer de mama

Abuela paterna con cáncer de ovario

Tía paterna con cáncer de mama



Caso 1: Cáncer de mama y ovario familiar

- ✓ Panel de 17 genes asociados a susceptibilidad de padecer cáncer de mama y/o ovario: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (exones 6-7-8-10), *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*,
- ✓ Interpretación de variantes detectadas (*VariantStudio v3.0*)

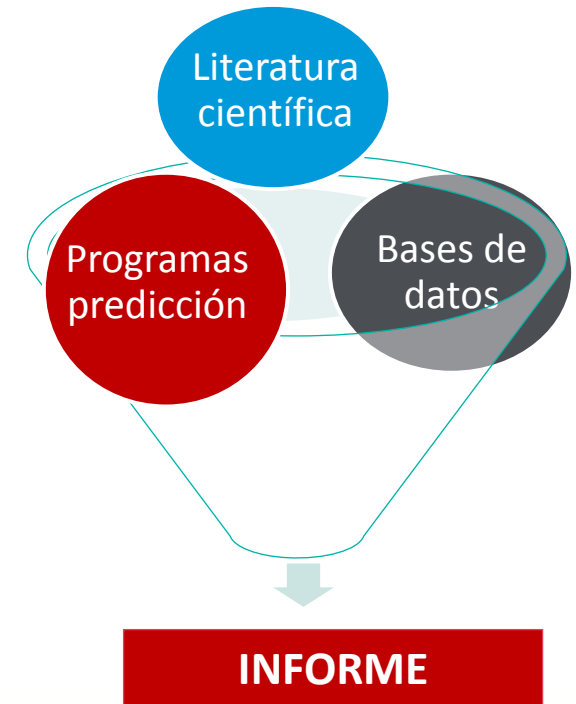
BRCA2 (13q13.1)
Exón 11
c.6800G>C (p.Ser2267*)
NM_000059 (NP_000050)

No descrita en población general
ni en la literatura
Codón de parada prematuro
(efecto deletéreo)

**Variante probablemente
patogénica (Clase 4)**

Validación

CHR	chrBP ID	Type	Variant	Exon	Filter	Quality	QX	Inherited From	Alt Variant Freq	Di
13	11173673	inv	T>C	yes	PA05	131889	99		100	
13	11173673	inv	G>A	yes	PA05	130066	90		97.8	
13	11173673	inv	T>C	yes	PA05	107458	84		100	
13	11173673	inv	G>T	yes	PA05	134883	99		51.8	
13	11173673	inv	T>T	yes	PA05	131061	99		94	
13	11173673	inv	G>G	yes	PA05	118931	99		99	
13	11173673	inv	C>T	yes	PA05	134562	99		52.8	
13	11173673	inv	T>C	yes	PA05	288207	99		96.1	
13	11173673	inv	A>G	yes	PA05	310344	99		100	
13	11173673	inv	T>T	yes	PA05	360583	99		50	
13	11173673	inv	T>T	yes	PA05	24042	99		34.6	
13	11173673	inv	A>T	yes	PA05	213374	99		100	
13	11173673	inv	G>A	yes	PA05	291715	99		100	
13	11173673	inv	C>T	yes	PA05	16263	99		34.5	
13	11173673	inv	C>C	yes	PA05	42363	99		61.1	
13	11173673	inv	G>A	yes	PA05	14818	99		23.8	
13	11173673	inv	T>C	yes	PA05	300227	70		100	
13	11173673	inv	G>G	yes	PA05	177775	99		61	



Caso 1: Cáncer de mama y ovario familiar

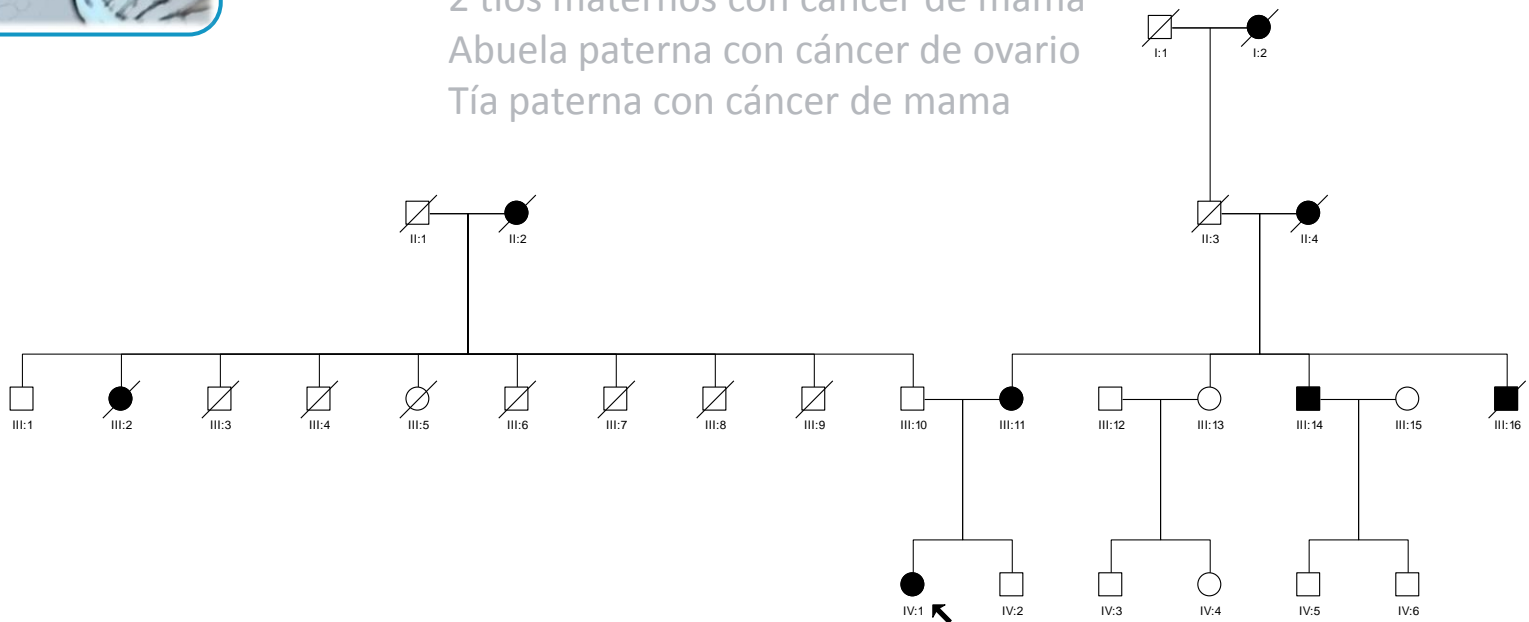
Servicio de Genética



Motivo de consulta: Mujer de 34 años derivada de Oncología por Carcinoma ductal infiltrante.

Antecedentes familiares:

- Madre cáncer de mama (dx a los 59)
- Abuela materna cáncer de ovario (fallecida a los 59 años)
- 2 tíos maternos con cáncer de mama
- Abuela paterna con cáncer de ovario
- Tía paterna con cáncer de mama



Estudio de otros familiares afectados.

Segregación SI: reclasificación variante patogénica

Caso 1: Cáncer de mama y ovario familiar

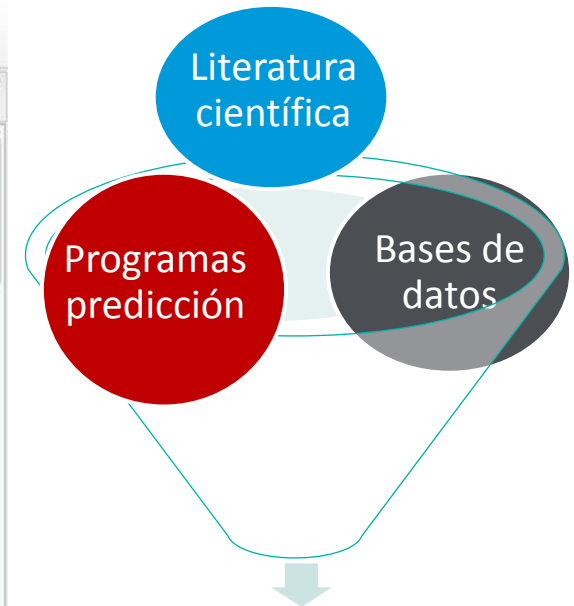
- ✓ Panel de 17 genes asociados a susceptibilidad de padecer cáncer de mama y/o ovario: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (exones 6-7-8-10), *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*,
- ✓ Interpretación de variantes detectadas (*VariantStudio v3.0*)

NO INFORMATIVO ≠ **NEGATIVO**

El resultado de este estudio no es informativo, ya que **no se ha identificado la causa genética** de su enfermedad. Por tanto, el asesoramiento tendrá que basarse exclusivamente en los antecedentes personales y familiares.

Se recomienda seguimiento clínico del paciente.

El paciente debe recibir asesoramiento genético en una consulta especializada.



PANEL DE GENES (paneles reales)

Secuenciamos y analizamos los genes que están incluidos en el panel



Caso 1: **Cáncer de mama y ovario familiar**

EXOMA CLÍNICO (paneles virtuales)

Secuenciamos ~ 4700 genes asociados a enfermedad y filtramos los genes de interés según sospecha clínica



Caso 2: **Retraso madurativo con microcefalia**



Caso 2: Discapacidad Intelectual y microcefalia

Servicio de Pediatría



Servicio de Genética



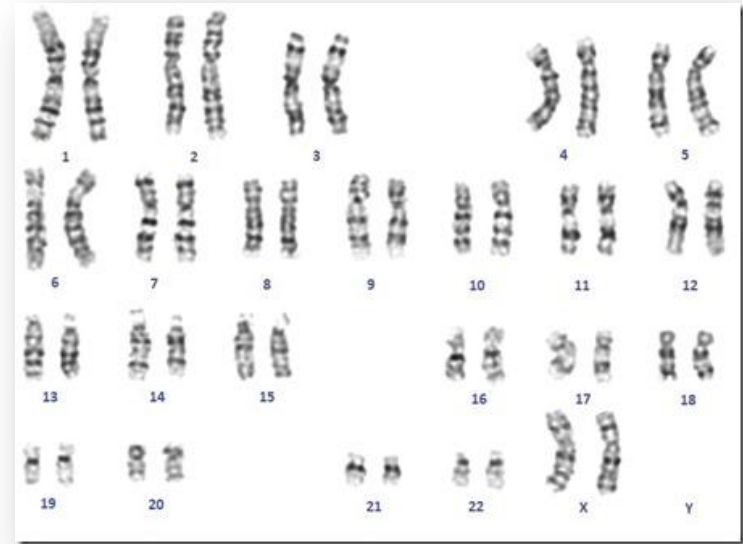
Motivo de consulta:

Niña de 15 años, en seguimiento por:

- ✓ Discapacidad Intelectual
- ✓ Retraso del lenguaje
- ✓ Microcefalia



- ❖ **Citogenética:** Cariotipo 46,XX normal
Array CGH 60K normal



Caso 2: Discapacidad Intelectual y microcefalia

- ✓ **Exoma clínico:** NGS de 4813 genes (panel virtual DI)
- ✓ Filtrado de 134 genes asociados a DI
- ✓ Interpretación de variantes detectadas (*VariantStudio v3,0*)

Literatura científica

Programas predicción

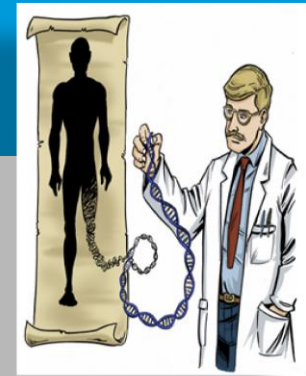
Bases de datos

Detallada historia clínica

NO INFORMATIVO

134 Genes estudiados

ABCD1	DNM1	IQSEC2	OFD1	SHANK3
ACSL4	DYNC1H1	KCNJ10	OPHN1	SLC16A2
ADNP	DYRK1A	KDM5C	OTC	SLC2A1
ALG13	EHMT1	KIAA2022	PAK3	SLC6A1
ANKRD11	FGD1	KIF1A	PCDH19	SLC6A8
AP1S2	FLNA	L1CAM	PDHA1	SLC9A6
AP4B1	FMR1	LAMP2	PHF6	SMARCA2
ARHGEF9	FOLR1	LINS	PHF8	SMARCA4
ARID1B	FOXG1	MAN1B1	PIGA	SMARCB1
ARX	FOXP1	MAOA	PIGN	SMC1A
ATP7A	FOXP2	MBD5	PLP1	SMC3
ATRX	FTSJ1	MECP2	PNKP	SMS
BRWD3	GAMT	MED12	POGZ	ST3GAL3
CA8	GATM	MED13L	PORCN	STXBP1
CACNA1A	GDI1	MED23	PPT1	SYN1
CASK	GPC3	MEF2C	PQBP1	SYNGAP1
CC2D1A	GRIA3	MID1	PTCHD1	TCF4
CDKL5	GRIN1	NDP	PTEN	TIMM8A
CHD2	GRIN2A	NDUFA1	PTPN11	TRAPPC9
CHD7	GRIN2B	NHS	RAB39B	TUSC3
CHD8	HCN1	NIPBL	RAD21	UBE2A
CNTNAP2	HDAC8	NLGN3	RAI1	UBE3A
CREBBP	HNRNPU	NLGN4X	RPL10	UPF3B
CUL4B	HOXA1	NRXN1	RPS6KA3	VPS13B
DCX	HPRT1	NSD1	SATB2	WDR45
DHCR7	HUWE1	NSUN2	SCN2A	ZEB2
DLG3	IDS	OCRL	SCN8A	



Caso 2: Retraso madurativo y microcefalia

- ✓ Exoma clínico: NGS de 4813 genes (panel virtual microcefalia)
- ✓ Filtrado de **58 genes asociados a microcefalia**
- ✓ Interpretación de variantes detectadas

Literatura científica

Programas predicción

Bases de datos

Detallada historia clínica

Gene	Genotype	Chr	Coordinate	Classification	Intron	HGVSc	HGVSp	dbSNP ID	Type	Variant	Exonic	Filter	Quality	GQX	Inherited From	All Variant Freq	Di
ORC4	het	2	148701099	...	9/13	NM_181742.3:c.763-10_763-9delTT		rs78020809:rs53...	deletion	GAA>GAA/G	yes	PASS					
CTNMB1	het	3	41280807	...	15/15	NM_001904.3:c.2320C>T	NM_001904.3:c.2320C>T(p. =)	rs4135386	snv	C>C/T	yes	PASS					
CEP135	het	4	56841135	...	11/26	NM_025009.4:c.1473G>C	NP_079285.2:np.Lys491Asn		snv	G>G/C	yes	PASS					
CEP135	het	4	56885717	...	23/26	NM_025009.4:c.3211A>T	NP_079285.2:np.Lys1071Ter	rs200676378	snv	A>A/T	yes	PASS					
RAB18	het	10	27830273	...	8/8	NM_001256410.1:c.*3308delT			deletion	CTT>C/CT	yes	PASS					
RAB18	het	10	27830273	...	8/8	NM_001256410.1:c.*3307_*3308delTT		rs775373330	deletion	CTT>CT/C	yes	PASS					
ORC6	het	16	46732095	...	7/7	NM_014321.3:c.*623_*630dupGATAGATA		rs322278823	insertion	G>G/GGA...	yes	PASS					

Genes analizados

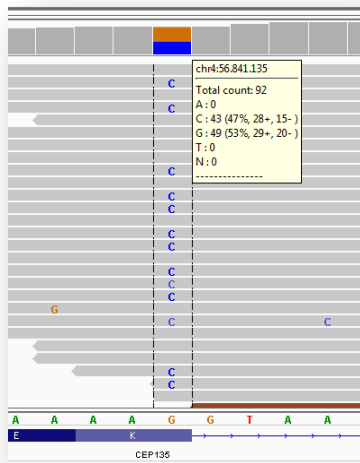
AP4M1	KIF11	RBBP8
ARFGEF2	LIG4	SLC25A19
ASPM	MCPH1	SLC2A1
ATR	MECP2	SLC9A6
ATRX	MED17	STIL
CASC5	MFSD2A	TCF4
CASK	NBN	TRAPPC9
CDC6	NDE1	TSEN2
CDK5RAP2	NHEJ1	TSEN34
CDKL5	ORC1	TSEN54
CDT1	ORC4	TUBB2B
CENPJ	ORC6	TUBGCP4
CEP135	PAFAH1B1	TUBGCP6
CEP152	PCNT	UBE3A
CEP63	PNKP	VPS13B
CTNNB1	POMT1	WDR62
DYRK1A	PQBP1	WWOX
EFTUD2	RAB18	ZEB2
FOXG1	RAB3GAP1	
IER3IP1	RAB3GAP2	

Caso 2: Retraso madurativo y microcefalia. Gen *CEP135*

Alelo paterno

***CEP135* (4q12)**

c.1473G>C (p.491Asn)
Exón 11; NM_025009



Microcefalia autosómica recesiva (MIM611423)

INHERITANCE
- Autosomal recessive

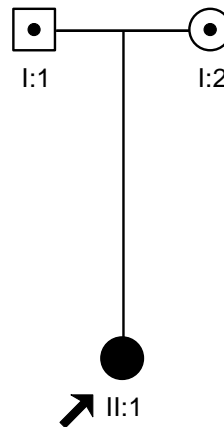
HEAD & NECK
Head
- Microcephaly (-12 to -14.5 SD) **▲**
- Sloping forehead **▲**

Face
- Retrognathia **▲**

NEUROLOGIC
Central Nervous System
- Mental retardation, severe
- Unintelligible speech

MISCELLANEOUS
- Onset at birth
- Two unrelated consanguineous Pakistani families have been reported (last curated March 2017)

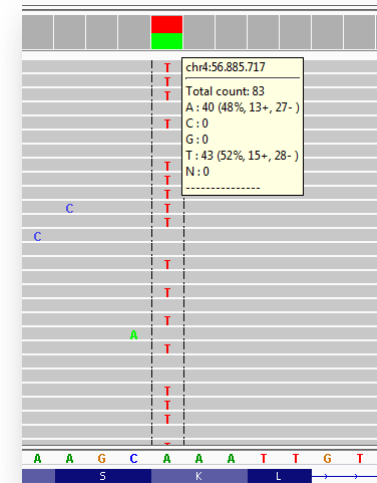
MOLECULAR BASIS
- Caused by mutation in the 135-kD centrosomal protein gene (CEP135, 611423.0001)



Alelo materno

***CEP135* (4q12)**

c.3211A>T (p.Lys1071*)
Exón 23; NM_025009



No descrita en población general ni en la literatura. Codon parada prematura

Probablemente patológica (Clase 4)

Confirmación y segregación por Sanger

No descrita en población general ni en la literatura. Predicción patológica
Probablemente patológica (Clase 4)



La NGS permite secuenciar muchos genes simultáneamente, mejorando el rendimiento diagnóstico



Su principal limitación/reto son las variantes de significado clínico incierto y hallazgos inesperado o secundarios



Es fundamental disponer de una **buena historia clínica** del paciente para orientar el diagnóstico clínico y realizar informes genéticos útiles



La NGS tiene limitaciones y un resultado **no informativo** NO significa que sea un resultado negativo



Dr. Saoud Sfawiri

Dra. Isabel Lorda

Dra. Pinilla Rodriguez

Dra. Marta Rodriguez

Dra. Rosa Riveiro

Dra. M^º José Trujillo

Dra. Almudena Ávila Fernández

Dra. Ana Bustamante

Miguel Ángel Fernández

Dra M^º José Trujillo

Dra. Carmen Ayuso

Muchas gracias

Dra Ana Arteché López

ana.artech@quironsalud.es





Hospital General de Villalba

 **Comunidad de Madrid**

Dra Ana Arteché López
ana.arteché@quironsalud.es