

Aplicación de las Nuevas Tecnologías a la Biomedicina:

José M. Millán

Unidad de Genética. IIS-La Fe

CIBER de Enfermedades Raras

Unidad de Genética, Hospital U. La Fe

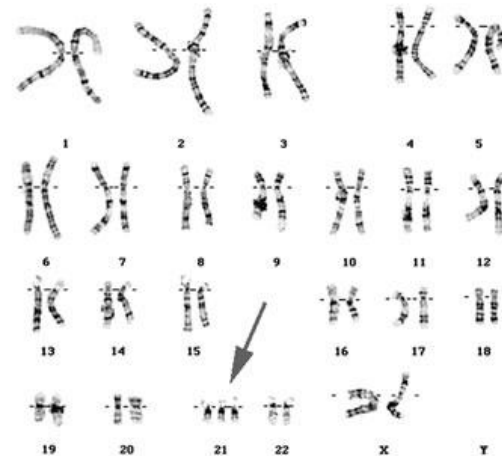
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias
 - Postnatal
 - Prenatal
 - Preimplantacional (DGP)



- Sección Citogenética
- Sección Molecular

Citogenética

- Cariotipo convencional en pacientes con sospecha
- Cariotipo en fetos con sospecha o embarazos de edad materna elevada



Genética Molecular

- Confirmación de sospecha clínica/
Estudios presintomáticos
 - Secuenciación de genes candidatos
 - Aplicación de otras técnicas (OLA, MLPA, aCGH...)
- **Diagnóstico prenatal o preimplantacional en casos previamente diagnosticados desde el punto de vista genético**



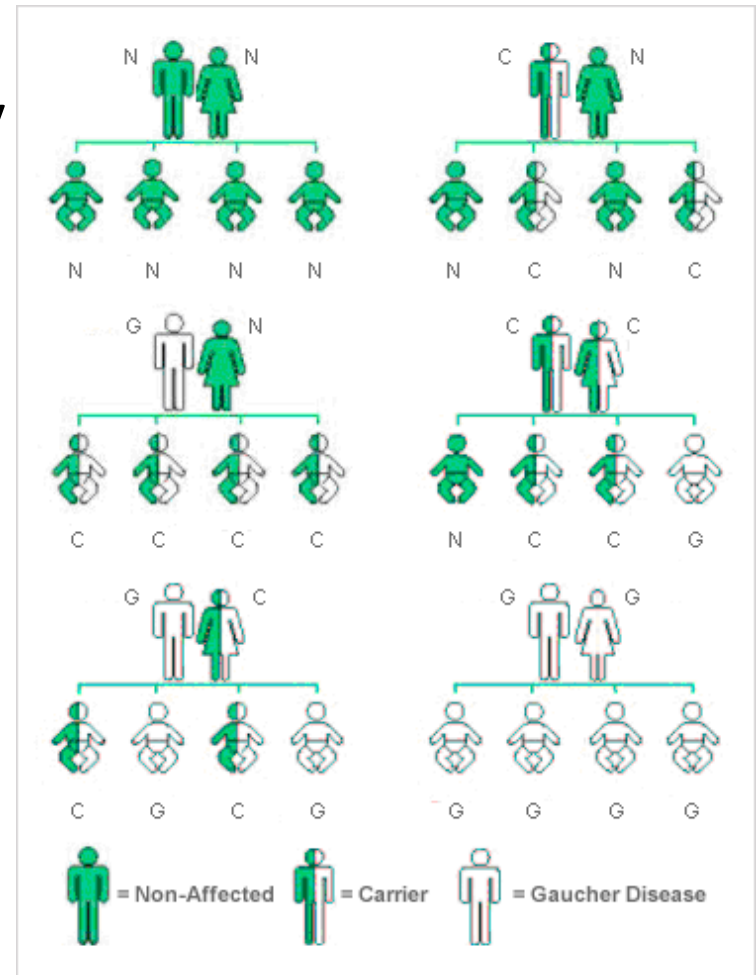
- Nuestro objetivo: enfermedades mendelianas (raras y huérfanas)

- Posibilidades:
 - Asesoramiento genético
 - DGP
 - Creación de grupos homogéneos para futuros ensayos clínicos



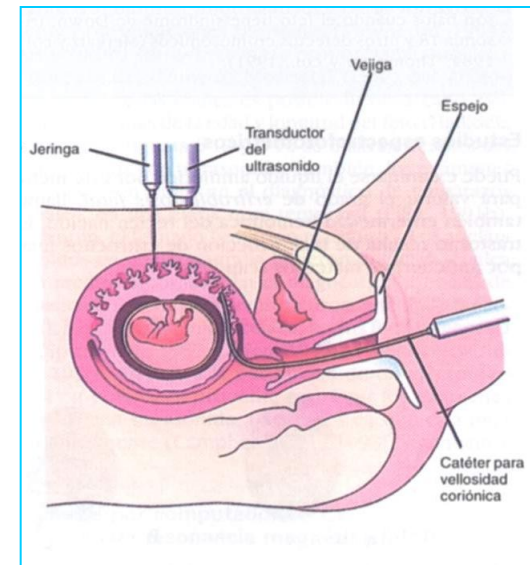
Asesoramiento genético

- Ofrecer la información médica y científica disponible a aquellas personas afectadas por una enfermedad o con riesgo de padecer o transmitir una determinada enfermedad a su descendencia
 - Diagnóstico (a veces difícil)
 - Estima del riesgo
 - DGP



Diagnóstico Prenatal

- Detección de anomalías en embarazos de riesgo
 - Prueba invasiva: biopsia corial (10-12 sem) o amniocentesis (16 sem)
 - Riesgo de pérdida fetal. 1-3%
 - La certeza del resultado es la misma que la de portador/es
 - Si feto afecto, posibilidad de IVE antes de las 22 sem.
 - Si feto sano, probabilidad de niñ@ san@ en casa del 100%



Transcervical (9 – 11 sem.)

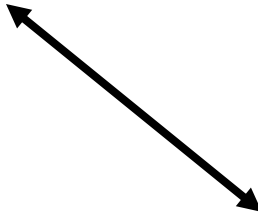
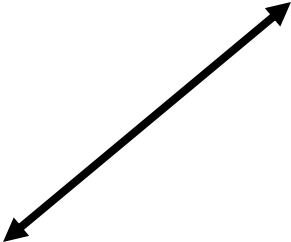


Diagnóstico Preimplantacional

- Selección activa de pre-embryones libres de la enfermedad
 - Estimulación ovárica
 - Obtención de óvulos
 - Inseminación in vitro (ICSI)
 - Biopsia de embryones de 2/3 días (una sola cel.)
 - Implantación embrión sano
 - Diagnóstico prenatal posterior (certeza del 95%)
 - Probabilidad niño@ sano@ en casa del 25%



Enfermedad



Población



Tecnología

1. Enfermedad de base genética

- Germinal
 - Mendeliana simple
 - Mendeliana genéticamente heterogénea
 - Enfermedad compleja
- Somática

Mendeliana simple (una enfermedad: un gen)

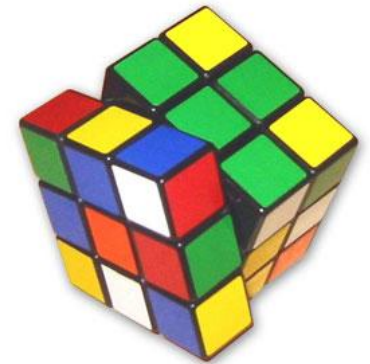


- Acondroplasia: AD; *FGFR3*, p.G380R
- Atrofia Muscular Espinal: AR; *SMN1*, delE7
- Fibrosis Quística: AR; *CFTR*, deltaF508

Mendeliana Genéticamente Heterogénea

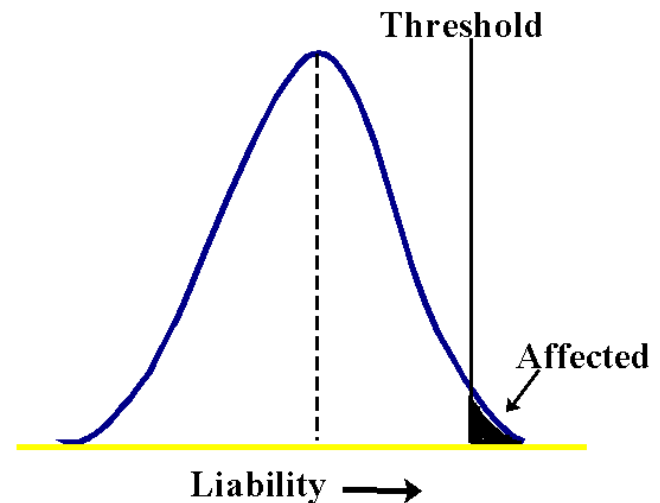
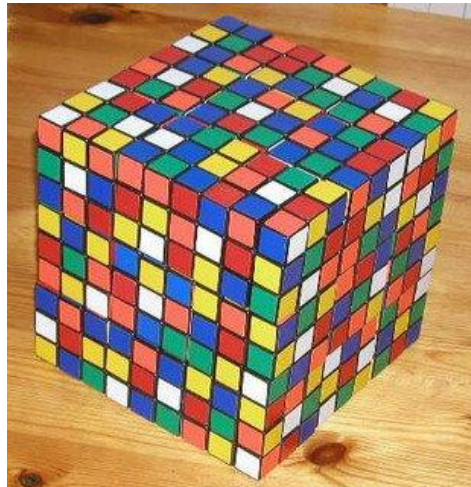
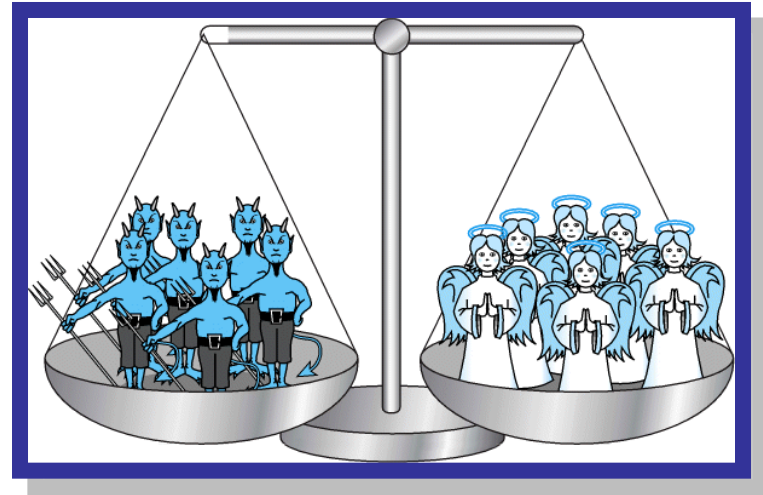


- Retinosis Pigmentaria: AD, AR, XL, Mit; > 40 genes; > 100 loci
- Síndrome de Usher: AR; 9 genes, 12 loci
- Charcot-Marie-Tooth: AD, AR y XL; 40 genes
- Distrofias musculares: AD, AR, SL, Mit. Muchos tipos, muchos genes
- Ataxia hereditaria: AD, AR, XL...



Enfermedades complejas

- Asma
- Artritis reumatoide
- DMAE
- Esclerosis múltiple
- Alzheimer
- HTA
- Ictus
- Cáncer...

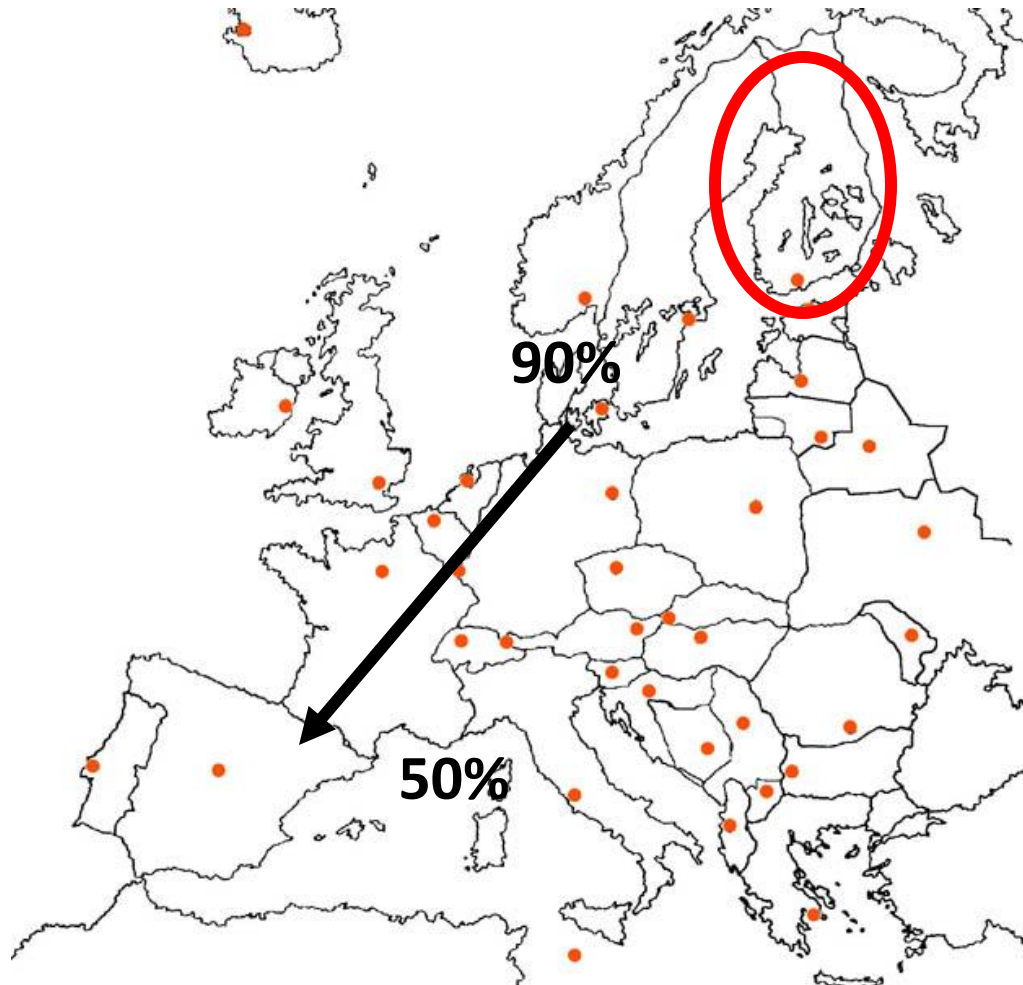


2. La población



Las frecuencias alélicas, los polimorfismos (SNPs) y las enfermedades no se distribuyen homogéneamente

Delta F508 *CFTR*



FDH (Finnish Disease Heritage)

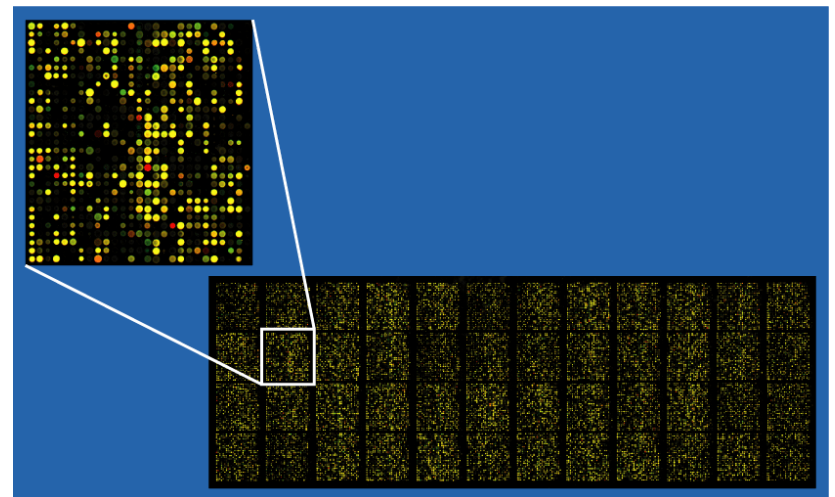
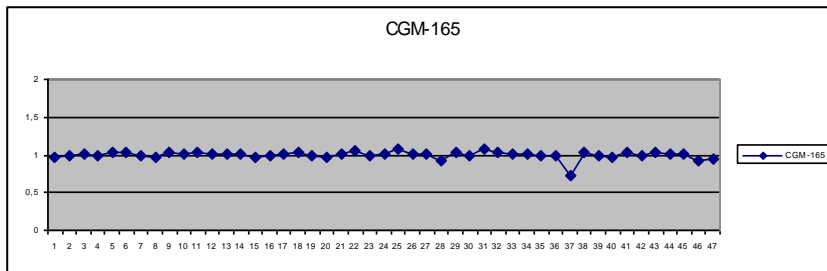
- Ausencia de enfermedades hereditarias comunes en el resto de Europa
- Presencia de otras muy raras
- Mutaciones muy prevalentes entre los pacientes



- Hipoacusias:
 - Mutaciones en *GJB2* explican el 30-35% de los casos. c.35delG responsable de un 80-50% (tasa de portadores del 3%)
 - Población gitana: p.W24X
 - Asia: c.235delC
 - Ashkenazi: c.167delT (tasa de portadores del 4%)
- Trastornos del movimiento (Corea):
 - *IT-15*: Enfermedad de Huntington. Caucásicos
 - *DRPLA*: Japoneses
 - *JHP3*: Subsaharianos

3. La tecnología

- Las nuevas tecnologías (NGS) permiten: a) detectar lo indetectable mediante técnicas tradicionales y b) hacer más fácil y sencillo lo que antes era complicado y largo

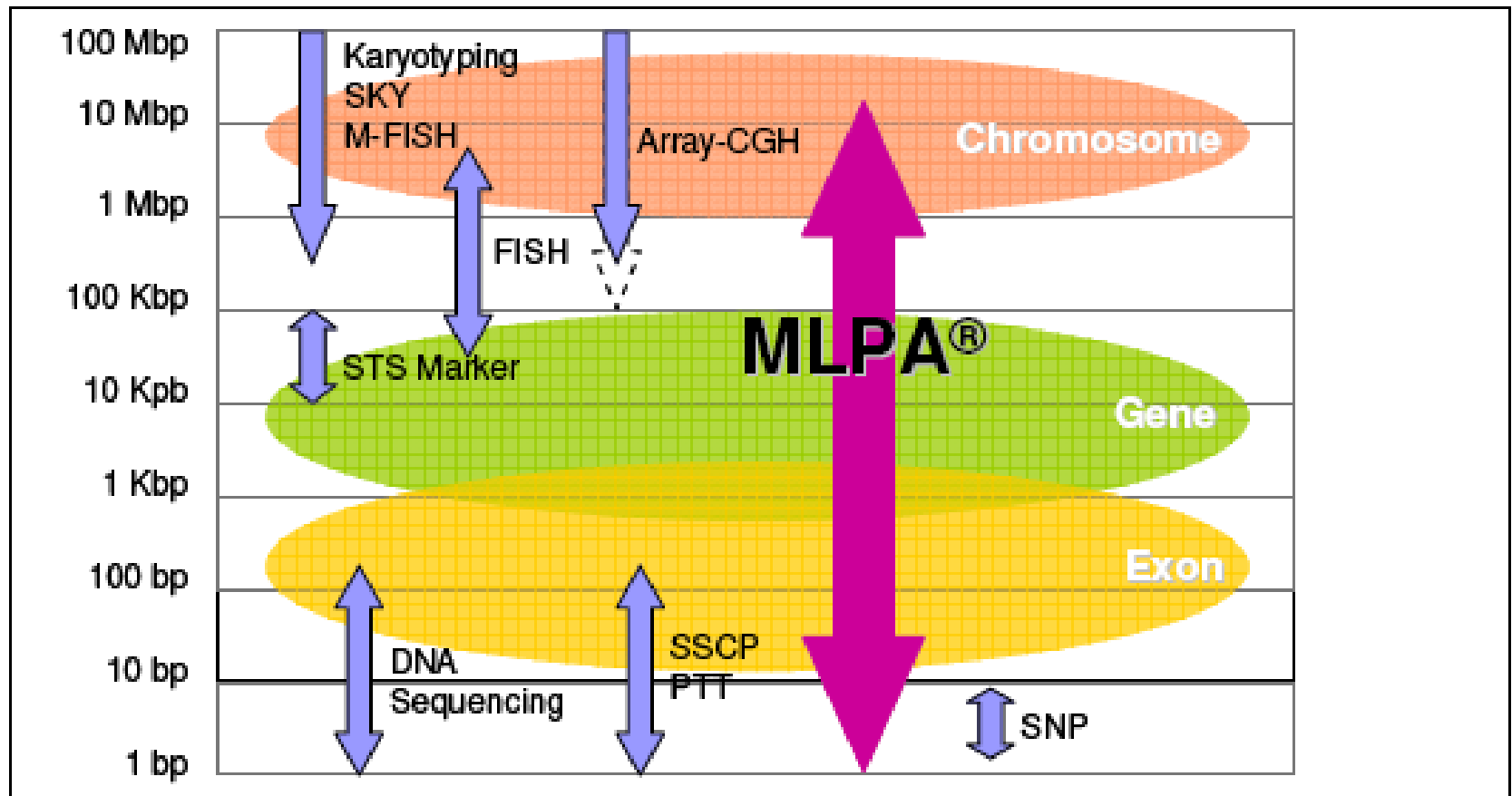


Aplicación de las nuevas tecnologías

- array-APEX u OLA para detección de mutaciones puntuales
- MLPA para la detección del nº de copias de una región cromosómica pequeña o un gen determinado
- aCGH para la detección de regiones cromosómicas de tamaño variable o para diagnóstico prenatal
- SNP-array para enfermedades multifactoriales o respuesta a fármacos
- NGS (Next Generation Sequencing) para detección de mutaciones en enfermedades mendelianas heterogéneas

Tipos de defecto genético

- Alteraciones cromosómicas numéricas
- Alteraciones estructurales
- Pequeñas deleciones-duplicaciones
- Mutaciones puntuales
- Alteraciones epigenéticas



¡¡NO MATEMOS MOSCAS A CAÑONAZOS!!

Ejemplo: Acondroplasia ¡Importancia del diagnóstico clínico!



p.G380R en *FGFR3*; 98%

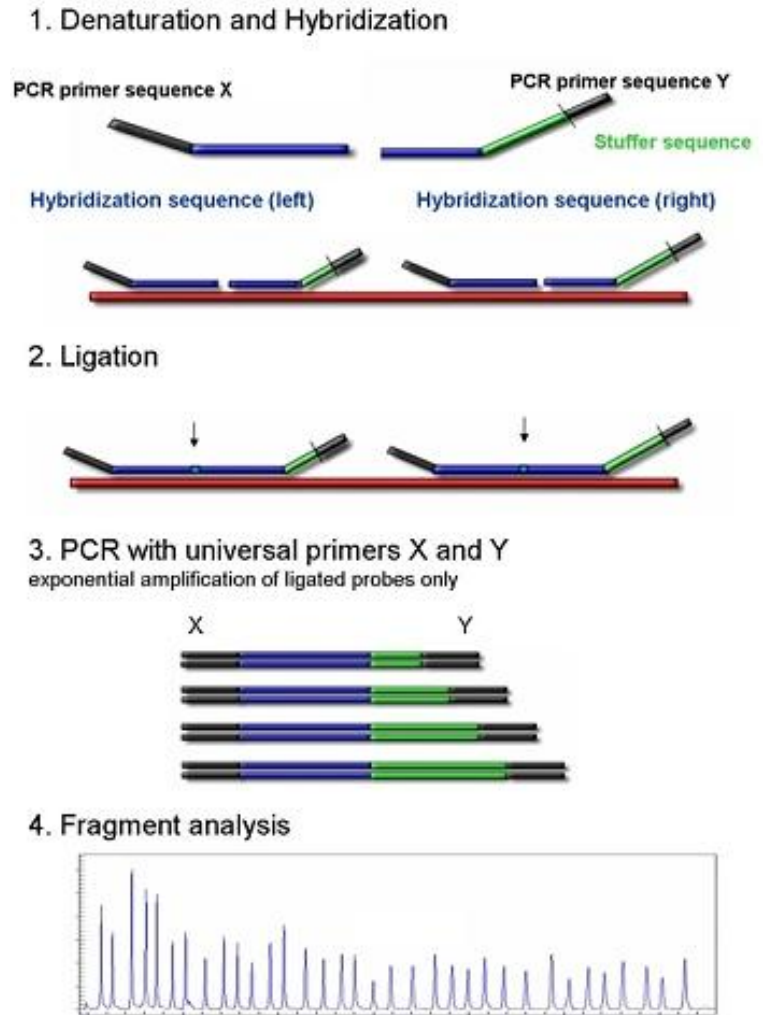
Otro Ejemplo: AME o DMD

MLPA: Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification

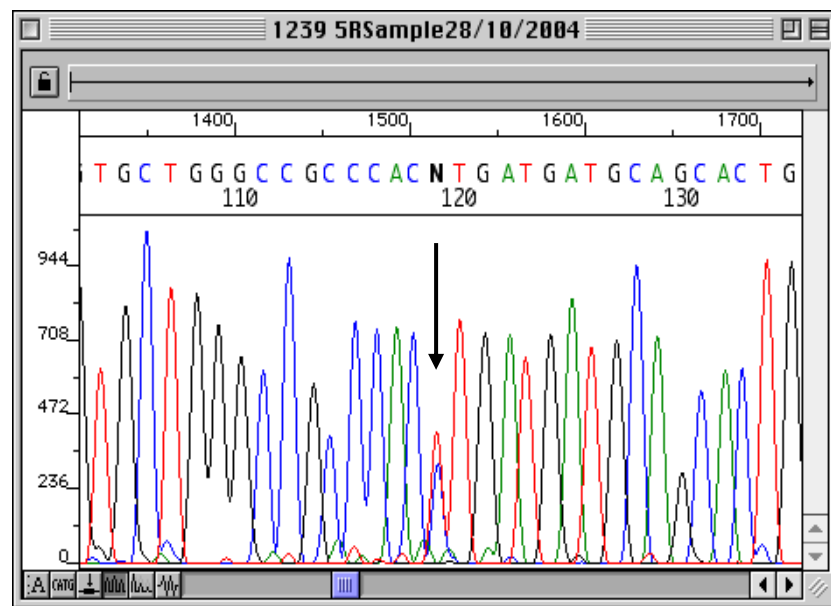
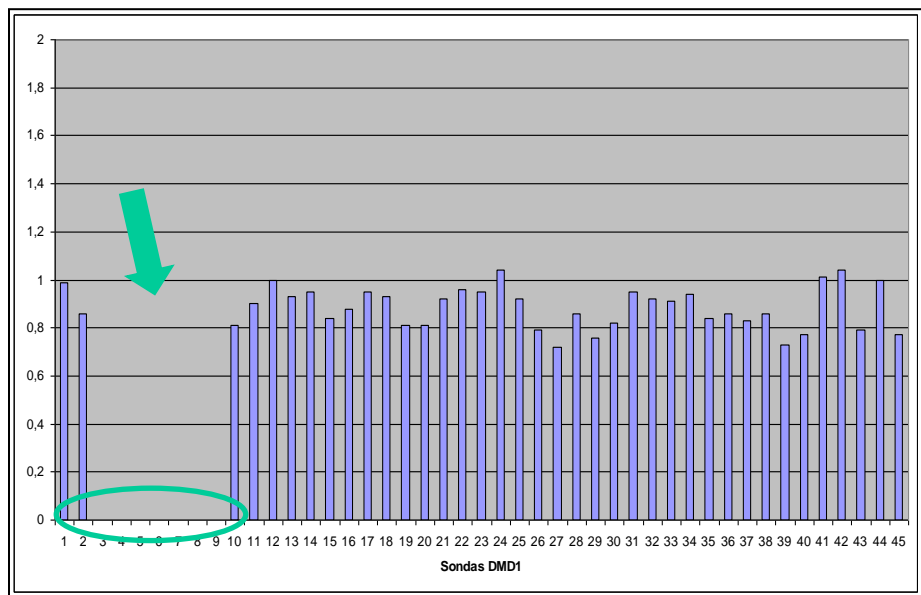
Debilidad muscular progresiva
y atrofia de los músculos
esqueléticos

-AME: 90% de los casos: deleción
homocigota de SMN1

-DMD: 75% de los casos: deleción o
duplicación de Dys



DMD



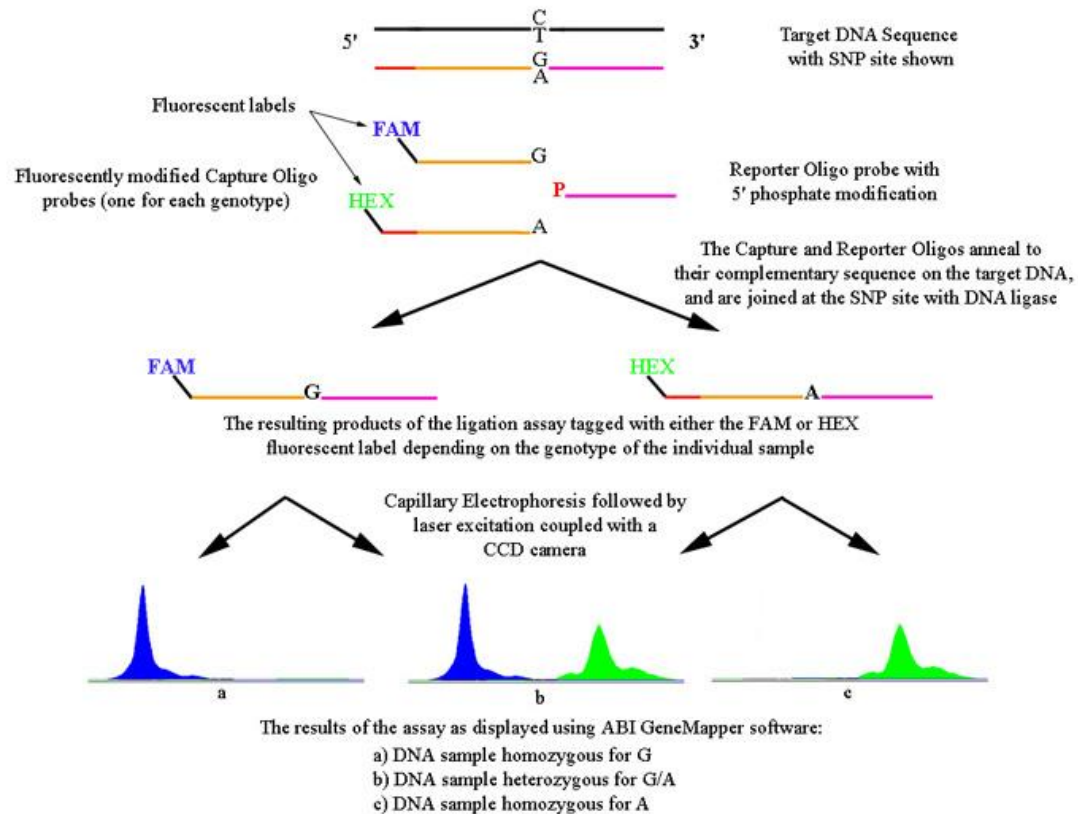
↓

Si MLPA negativo ---- biopsia muscular---- ausencia distrofina ---- secuenciación

↑

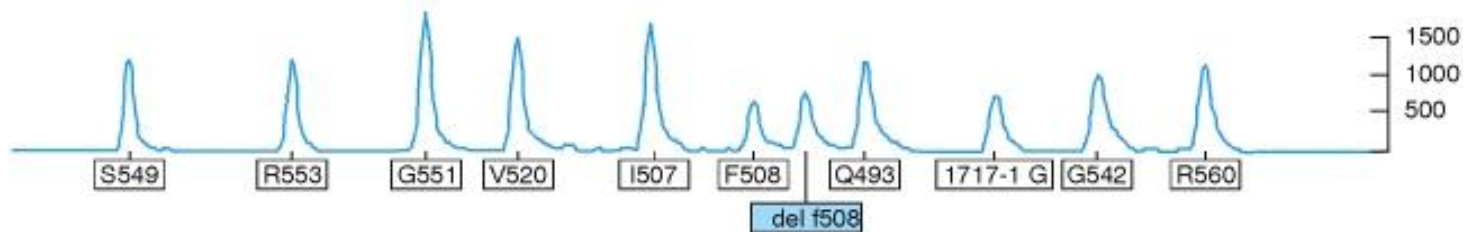
Fibrosis Quística

OLA: Oligonucleotide Ligation Assay

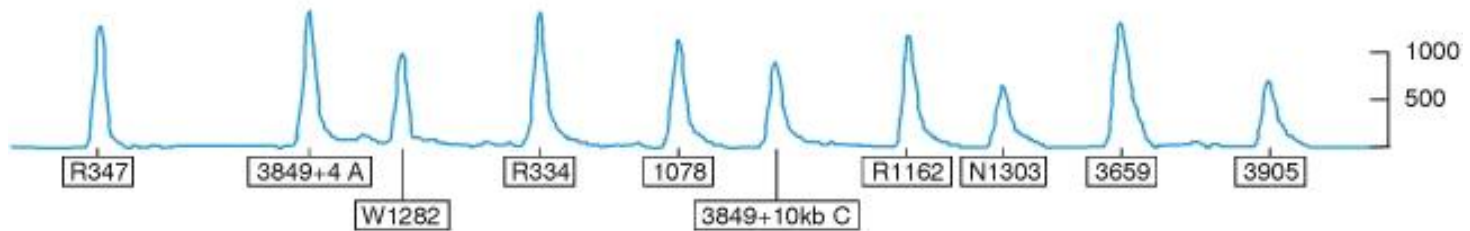


FQ: Delta F508-c.1898+1A

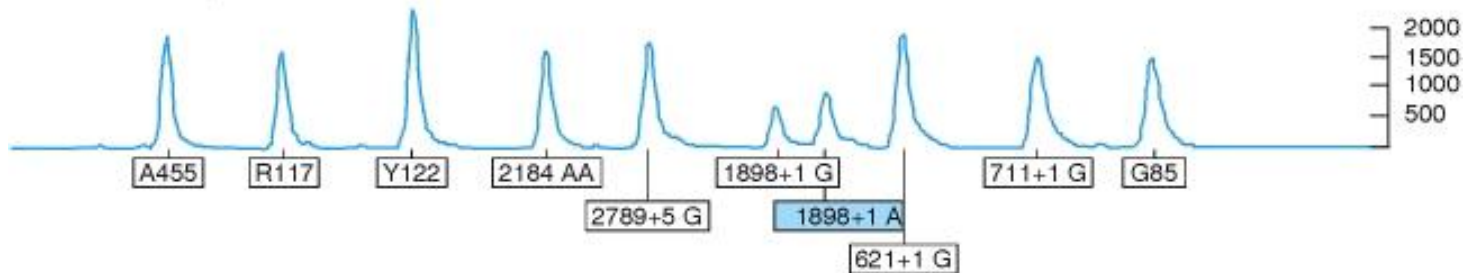
Blue labeled products



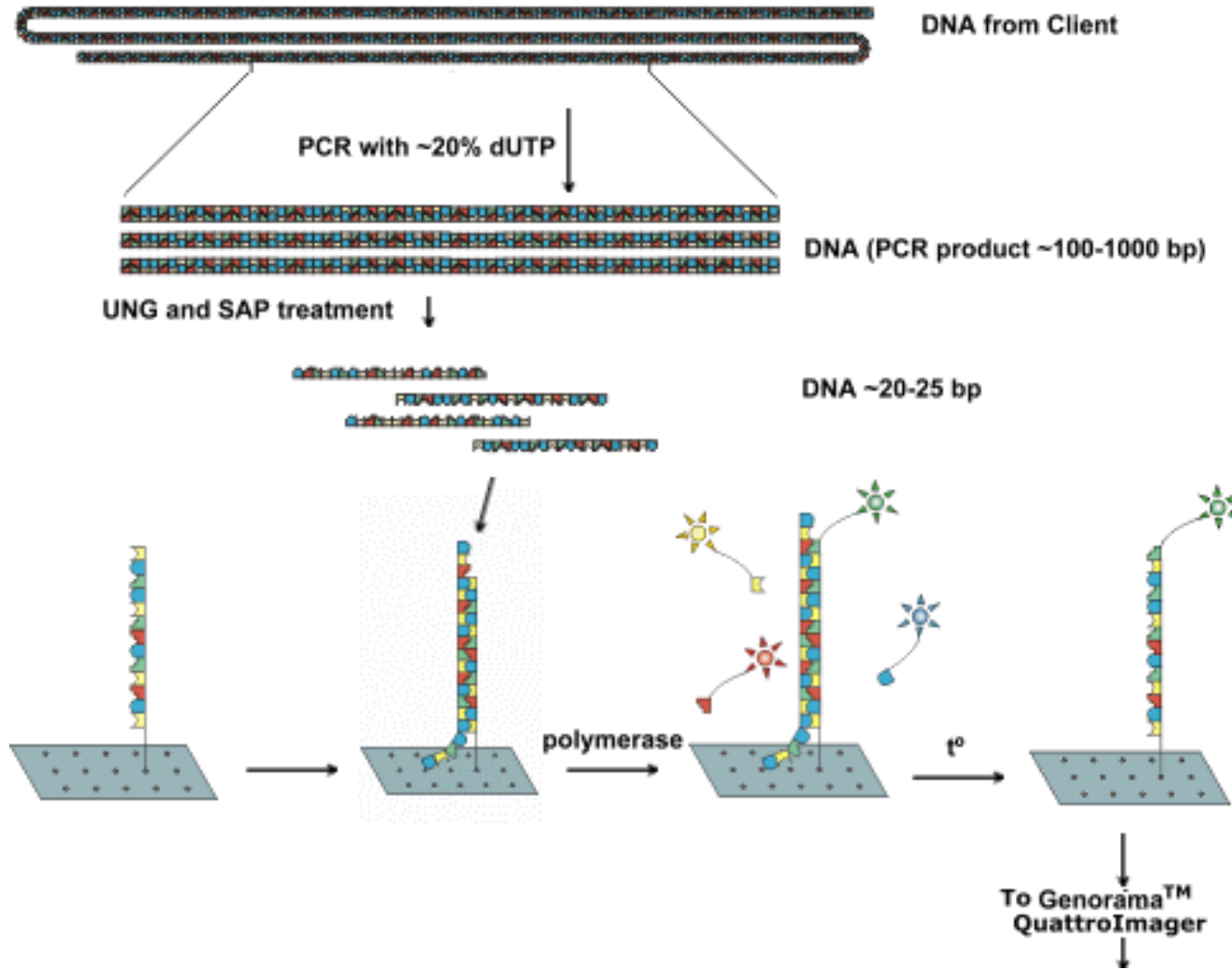
Green labeled products



Yellow labeled products



Microarray-APEX (Asper Biotech, Estonia)



Resultados Evaluación Microarray

Microarray-Based Mutation Analysis of 183 Spanish Families with Usher Syndrome

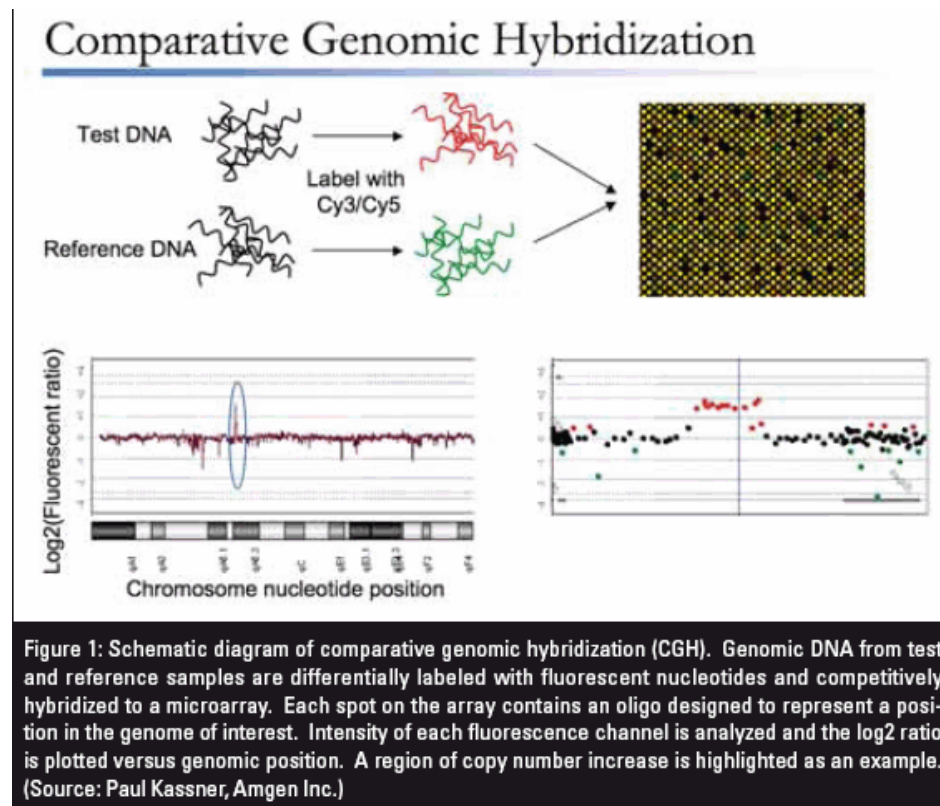
Teresa Jaijo,^{1,2} Elena Aller,^{1,2} Gema García-García,^{1,2} María J. Aparisi,¹ Sara Bernal,^{2,5} Almudena Ávila-Fernández,^{2,4} Isabel Barragán,^{2,5} Montserrat Baiget,^{2,5} Carmen Ayuso,^{2,4} Guillermo Antiñolo,^{2,5} Manuel Díaz-Llopis,⁵ Maigi Külm,⁷ Magdalena Beneyto,^{1,2} Carmen Nájera,⁹ and Jose M. Millán^{1,2}

	TOTAL	SIN MUTACIÓN	1 ALELO	2 ALELOS
	183	122	34	27
PACIENTES CON MUTACIÓN	61 / 183 = 33,3%			
ALELOS MUTADOS	88 / 366 = 24%			

	USH1	USH2	USH3	USH
PACIENTES CON MUTACIÓN	29,4%	39,4%	22,2%	15,8%
ALELOS MUTADOS	22,5%	27,4%	22,2%	10,5%

Aplicación de aCGH

- Clínica: Síndromes malformativos
- Investigación: Identificación de nuevos síndromes. Identificación puntos exactos de rotura



- Retraso mental:

Deambulaci3n: 1½ a1os

- Hidrocefalía (Arnold Chiari I)

- Rasgos dism3rficos:

orejas grandes de implantaci3n baja

nariz bulbosa

filtrum corto

labios gruesos

prognatismo

facies alargada

- Anomalias cong3nitas:

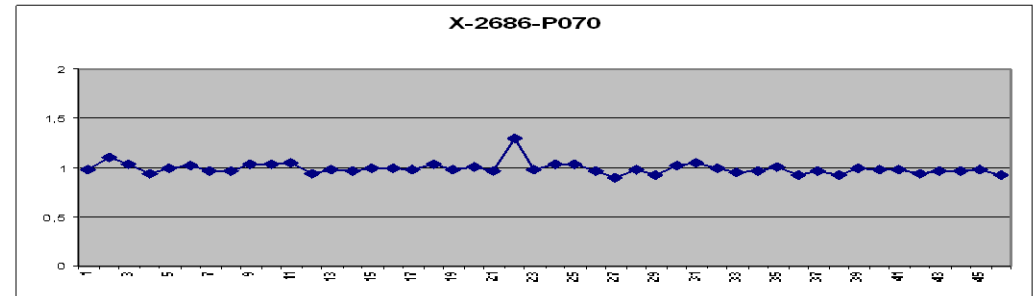
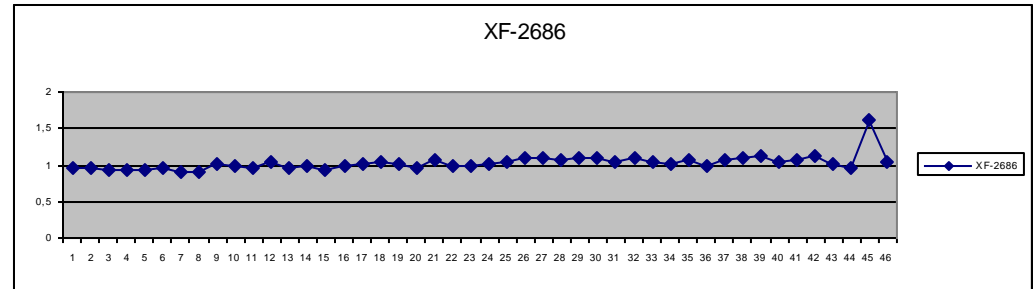
grandes dedos largos

escoliosis

- autolesiones, hiperactividad, no mantiene la mirada, trastorno del sue1o

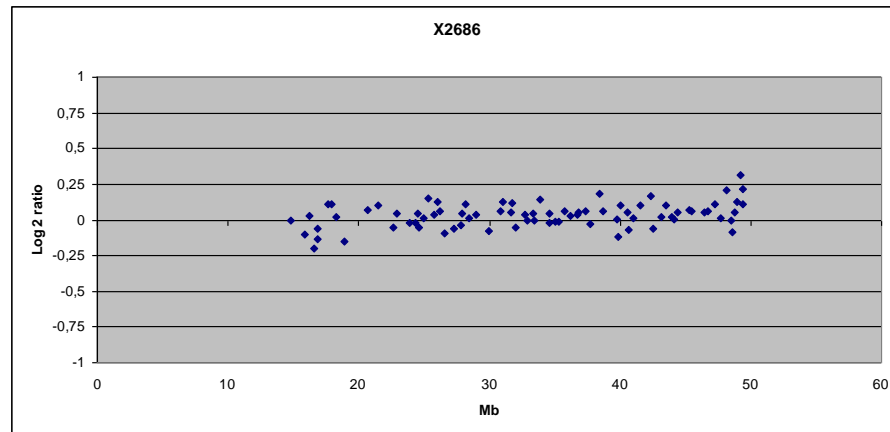
ESTUDIO MLPA

Chr. 1p	0,95952327	Chr. 1q	0,97531397
Chr. 2p	0,9530254	Chr. 2q	1,09735503
Chr. 3p	0,93148966	Chr. 3q	1,03048654
Chr. 4p	0,9192242	Chr. 4q	0,94418399
Chr. 5p	0,938991	Chr. 5q	0,99228633
Chr. 6p	0,95687107	Chr. 6q	1,02459817
Chr. 7p	0,90436435	Chr. 7q	0,96638617
Chr. 8p	0,91440252	Chr. 8q	0,96412982
Chr. 9p	1,0106668	Chr. 9q	1,03403541
Chr. 10p	0,97724148	Chr. 10q	1,03203037
Chr. 11p	0,95887162	Chr. 11q	1,04384499
Chr. 12p	1,03773865	Chr. 12q	0,93538481
Chr. "13p"	0,95391788	Chr. 13q	0,97373386
Chr. "14p"	0,99210102	Chr. 14q	0,97032248
Chr. "15p"	0,92000946	Chr. 15q	0,99744319
Chr. 16p	0,97695371	Chr. 16q	0,99786097
Chr. 17p	1,02037145	Chr. 17q	0,97453856
Chr. 18p	1,03396299	Chr. 18q	1,03892625
Chr. 19p	1,00702465	Chr. 19q	0,97387427
Chr. 20p	0,95495677	Chr. 20q	1,00508798
Chr. "21p"	1,07395068	Chr. 21q	0,95933269
Chr. "22p"	0,98063788	Chr. 22q	1,29676733
Chr. X/Yp	0,98216304	Chr. Xq2	0,9850902
Chr. 1q	1,0176031	Chr. 1p	1,04045799
Chr. 2q	1,03809527	Chr. 2p	1,03217607
Chr. 3q	1,08335569	Chr. 3p	0,9668242
Chr. 4q	1,08831167	Chr. 4p	0,90096373
Chr. 5q	1,06748371	Chr. 5p	0,98593673
Chr. 6q	1,10955294	Chr. 6p	0,92198724
Chr. 7q	1,10410881	Chr. 7p	1,01480495
Chr. 8q	1,03371195	Chr. 8p	1,05355104
Chr. 9q	1,09326696	Chr. 9p	0,9963489
Chr. 10q	1,04491218	Chr. 10p	0,95843793
Chr. 11q	1,02142482	Chr. 11p	0,96709257
Chr. 12q	1,07783404	Chr. 12p	1,00422587
Chr. 13q	0,99803595	Chr. "13p"	0,92461329
Chr. 14q	1,05870599	Chr. "14p"	0,97175281
Chr. 15q	1,08989629	Chr. "15p"	0,92548444
Chr. 16q	1,11090076	Chr. 16p	0,99313085
Chr. 17q	1,02985337	Chr. 17p	0,97385831
Chr. 18q	1,05520211	Chr. 18p	0,97685256
Chr. 19q	1,11258235	Chr. 19p	0,93982912
Chr. 20q	1,01875211	Chr. 20p	0,96634912
Chr. 21q	0,94781026	Chr. "21p"	0,9708739
Chr. 22q	1,60500285	Chr. "22p"	0,97323396
Chr. X/Yq	1,02901571	Chr. Xp	0,92993673



ESTUDIO CGH-ARRAY

22	26243409	1201	RP11-5o6	0,059
22	26572943	782	RP11-79g21	-0,097
22	27275731	3760	RP11-329J7	-0,063
22	27826045	2899	RP11-213I15	-0,037
22	27894024	3293	CTA-57G9	0,043
22	28207380	1124	RP11-90d17	0,114
22	28459778	7307	RP11-76B20	0,009
22	28988003	2993	RP11-79g6	0,036
22	29963037	7332	RP3-515N1	-0,076
22	30853880	7207	RP11-127L4	0,065
22	31033573	2422	RP11-65f22	0,13
22	31613076	1530	RP11-70f2	0,056
22	31755469	4584	CTA-415G2	0,119
22	31999101	1069	RP11-5i24	-0,049
22	32692055	793	RP11-449b17A	0,038
22	32911916	2622	CTA-221H1	-0,002
22	33336076	628	RP11-129b19	0,048
22	33461170	1098	RP11-125j19	-0,005
22	33845763	2162	RP11-79b21	0,143
22	34596206	1125	RP11-62g2	0,041
22	34630796	388	RP11-89d12	-0,019
22	35031972	458	RP11-105i18	-0,014
22	35291176	2476	RP11-35i10	-0,014
22	35784972	898	RP11-90i17	0,06
22	36161053	3237	CTA-390B3	0,029
22	36706289	2424	RP11-235o23	0,038
22	36853541	3898	CTA-228A9	0,05
22	37334583	2431	RP11-108c6	0,059
22	37705269	3966	CTA-150C2	-0,025
22	38446808	7376	RP11-172B20	0,184
22	38706854	3050	RP11-4h24	0,062
22	39784316	3567	RP11-12M9	0,005
22	39878885	3630	RP11-422A16	-0,115
22	40068001	7380	RP5-979N1	0,106
22	40564531	1158	RP11-206b19	0,049
22	40687711	3594	CTA-250D10	-0,07
22	41013905	2038	RP11-81n15	0,01
22	41567303	7097	RP3-437M21	0,098
22	42356710	2154	RP11-116k16	0,164
22	42555876	7053	RP3-388M5	-0,063
22	43178638	3355	CTA-397C4	0,017
22	43495135	2043	RP11-49m22	0,099
22	43989176	3803	CTA-268H5	0,019
22	44152557	6570	RP11-102d24	0,003
22	44441107	7091	RP3-398C22	0,057
22	45304545	6551	RP3-439I8	0,068
22	45471040	3534	CTA-29F11	0,061
22	46411899	6621	RP11-191L9	0,053
22	46681227	1101	RP11-66m5	0,065
22	47235425	3312	CTA-299D3	0,111
22	47714199	6611	RP11-242b5	0,01
22	48182788	4518	CTA-722E9	0,208
22	48515586	6550	RP3-522J7	-0,001
22	48582920	6471	RP11-494o16	-0,087
22	48727871	6493	RP11-232e17	0,051
22	48929351	6596	RP3-402g11	0,124
22	49208400	6472	RP11-164E23	0,315
22	49380752	3207	CTA-799F10	0,113
22	49396742	7340	CTB-99K24	0,218



Instrucciones: Buscar usando el nombre de una secuencia, el nombre de un gen, locus, u otro punto o región de referencia. El caracter comodín * está permitido. Para concentrarse en una locación, pulsar sobre la regla. Usar los botones Avanzar/Acercar para cambiar la magnificación y la posición. Para grabar tal imagen, [marcar esta página](#).

Ejemplos: chr7:71890181..72690180, CFTR, DC0152, NM_148842.

[Hide banner] [Hide instructions] [Marcar esta Página] [Link to an image of this view] [Publication quality image] [Ayuda]

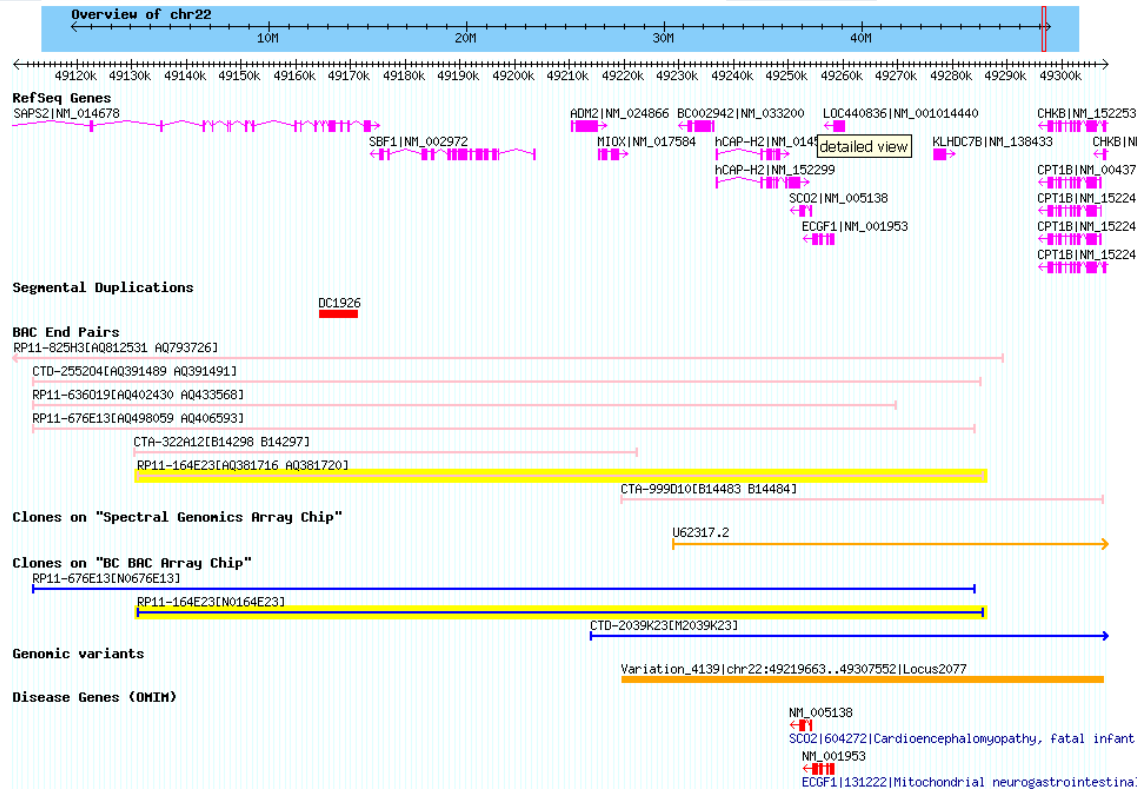
Run **eFISH** using the DNA sequence of the current window.

Punto o Región de Referencia

Flip

Avanzar/Acercar:

Mostrar 200 kbp



CONCLUSIONES

Experiencia limitada, pero creciente

Útiles en casos seleccionados

1. Fenotipo anormal con/sin RM (postnatal)

- *Estudios previos “normales”* (Car. alta resolución, MLPA subteloméricas /RM)
- *Alteración citogenética*: estudio reordenamientos cromosómicos

En desequilibrio (“de novo”):

acotar región cromosómica

Aparentemente equilibradas (“de novo”)

identificar posible desequilibrio

2. Estudio prenatal (!) o en abortos

Inconvenientes

- **Interpretación de los resultados**: polimorfismos, bases de datos, necesidad de estudio padres
- **Validez analítica y clínica**
- **Estudio coste-efectividad**

¡LO MÁS IMPORTANTE!



Investigación

Biochemistry and Molecular Biology

Identification of Large Rearrangements of the *PCDH15* Gene by Combined MLPA and Oligonucleotide CGH Array: Large Duplications Are Responsible for Usher Syndrome

Elena Aller,^{1,2} Teresa Jaijo,^{1,2} Gema García-García,¹ M. José Aparisi,¹ David Blesa,³ Manuel Díaz-Llopis,⁴ Carmen Ayuso,^{2,5} and José M. Millán^{1,2}

6 pacientes USH1 no relacionados

Previamente descartada la presencia de mutaciones puntuales en:

- MYO7A* (USH1B)
- USH1C* (USH1C)
- *CDH23* (USH1D)
- *USH1G* (USH1G)

-*PCDH15** (*una única mutación en heterocigosis*)

RESULTADOS MLPA

RP-1034

10-055.8 PCDH15 Exon 01A
10-055.8 PCDH15 Exon 01B
10-055.8 PCDH15 Exon 02A
10-055.8 PCDH15 Exon 02B
10-055.8 PCDH15 Exon 03
10-055.8 PCDH15 Exon 04
10-055.8 PCDH15 Exon 05
10-055.8 PCDH15 Exon 06
10-055.8 PCDH15 Exon 07
10-055.8 PCDH15 Exon 08
10-055.8 PCDH15 Exon 09
10-055.8 PCDH15 Exon 10
10-055.8 PCDH15 Exon 11
10-055.8 PCDH15 Exon 12
10-055.8 PCDH15 Exon 13
10-055.8 PCDH15 Exon 14
10-055.8 PCDH15 Exon 15
10-055.8 PCDH15 Exon 16
10-055.8 PCDH15 Exon 17
10-055.8 PCDH15 Exon 18
10-055.8 PCDH15 Exon 19
10-055.8 PCDH15 Exon 20
10-055.8 PCDH15 Exon 21
10-055.8 PCDH15 Exon 22
10-055.8 PCDH15 Exon 23
10-055.8 PCDH15 Exon 24
10-055.8 PCDH15 Exon 25
10-055.8 PCDH15 Exon 26
10-055.8 PCDH15 Exon 27
10-055.8 PCDH15 Exon 28
10-055.8 PCDH15 Exon 29
10-055.8 PCDH15 Exon 30
10-055.8 PCDH15 Exon 31
10-055.8 PCDH15 Exon 32

Normal (1,1)
Normal (1)
Normal (1,02)
Normal (1,03)
LOH (0,55)
Normal (1,02)
Normal (1,07)
Normal (1,04)
Normal (0,94)
Normal (0,97)
Normal (1,06)
Normal (0,94)
Normal (0,97)
Normal (1)
Normal (1,06)
Normal (1,18)
Normal (1,03)
Normal (1,06)
Normal (1,02)
Normal (0,98)
Normal (0,98)
Normal (1,02)
Normal (1,13)
Normal (0,98)
Normal (1,08)
Normal (0,99)
Normal (0,97)
Normal (0,93)
Normal (1)
Normal (1,03)
Normal (1,09)
Normal (1,11)
Normal (0,97)
Normal (1,18)

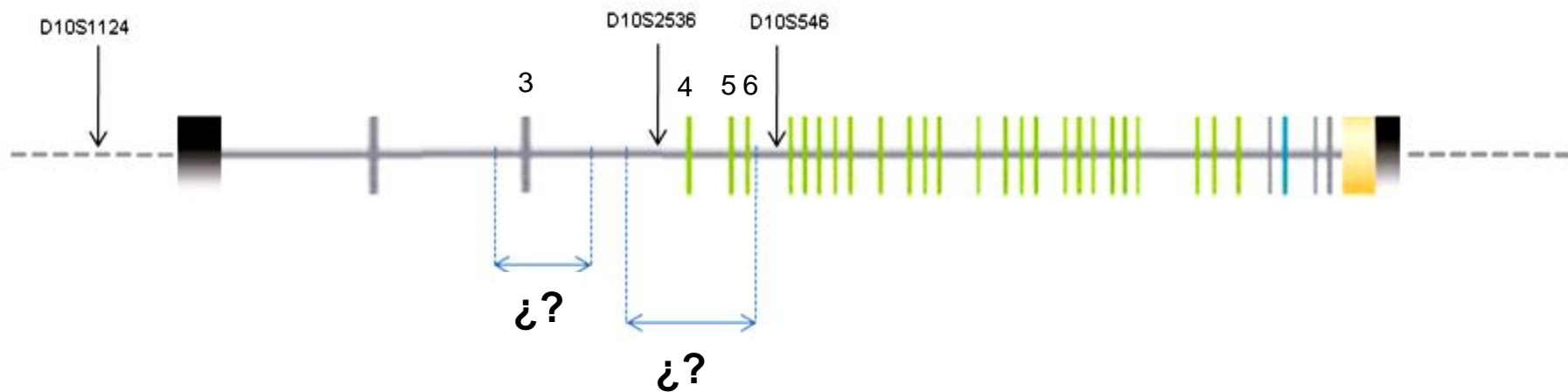
RP-367

Normal (1,15)
Normal (1,03)
Normal (1,12)
Normal (1,06)
Normal (1,03)
Gain (1,47)
Gain (1,56)
Gain (1,43)
Normal (1,14)
Normal (1,12)
Normal (1,2)
Normal (1,12)
Normal (1,09)
Normal (1,23)
Normal (1,07)
Normal (1,1)
Normal (1,23)
Normal (1,19)
Normal (1,04)
Normal (1,03)
Normal (1,09)
Normal (1,05)
Normal (1,11)
Normal (1,05)
Normal (1,05)
Normal (1,18)
Normal (0,99)
Normal (0,89)
Normal (1,14)
Normal (1,07)
Normal (1,1)
Normal (1,26)
Normal (1,06)
Normal (1,32)

RP-982

Normal (1,21)
Normal (1,08)
Normal (1,11)
Normal (1,09)
Normal (0,97)
Gain (2,06)
Gain (2,03)
Gain (1,9)
Normal (1,06)
Normal (1,1)
Normal (1,15)
Normal (1,1)
Normal (1,07)
Normal (1,22)
Normal (1,2)
Normal (1,22)
Normal (1,21)
Normal (1,21)
Normal (1,1)
Normal (1,04)
Normal (1,06)
Normal (1,06)
Normal (1,1)
Normal (1,05)
Normal (1,07)
Normal (1,19)
Normal (0,96)
Normal (1,01)
Normal (1,11)
Normal (1,16)
Normal (1,16)
Normal (1,32)
Normal (1,1)
Normal (1,32)

LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS PUNTOS DE ROTURA??

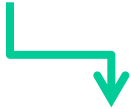


CGH-ARRAY

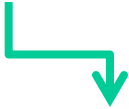
Dr. David Blesa

Servicio de Análisis de Microarrays

Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)

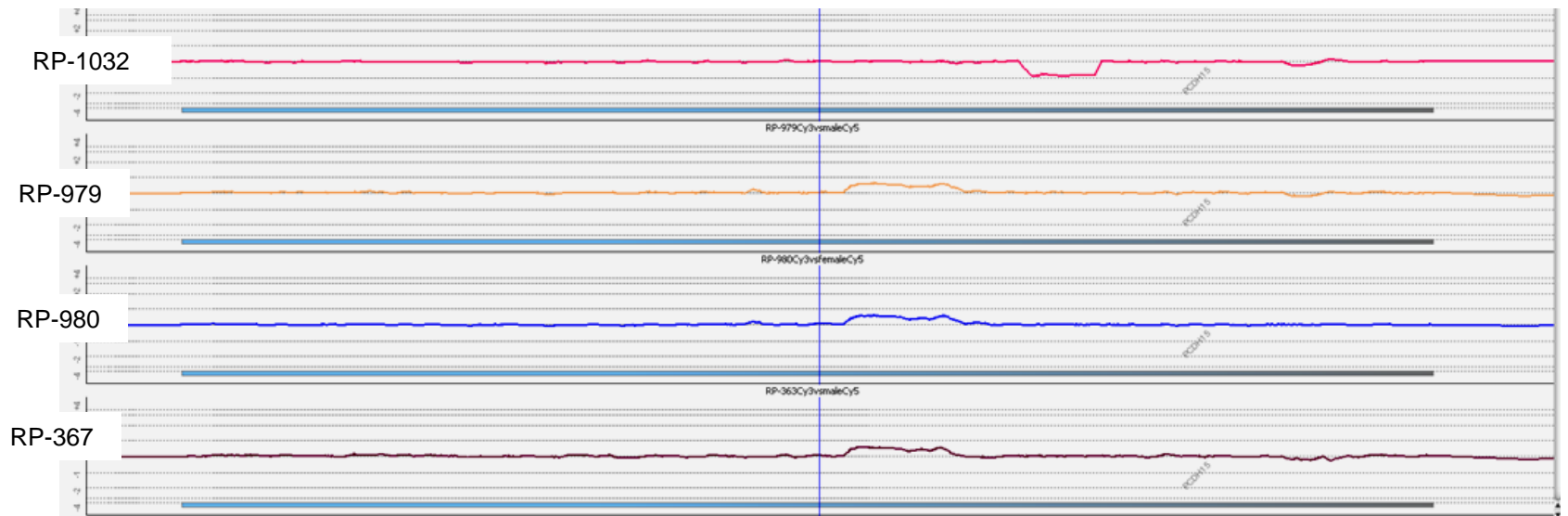
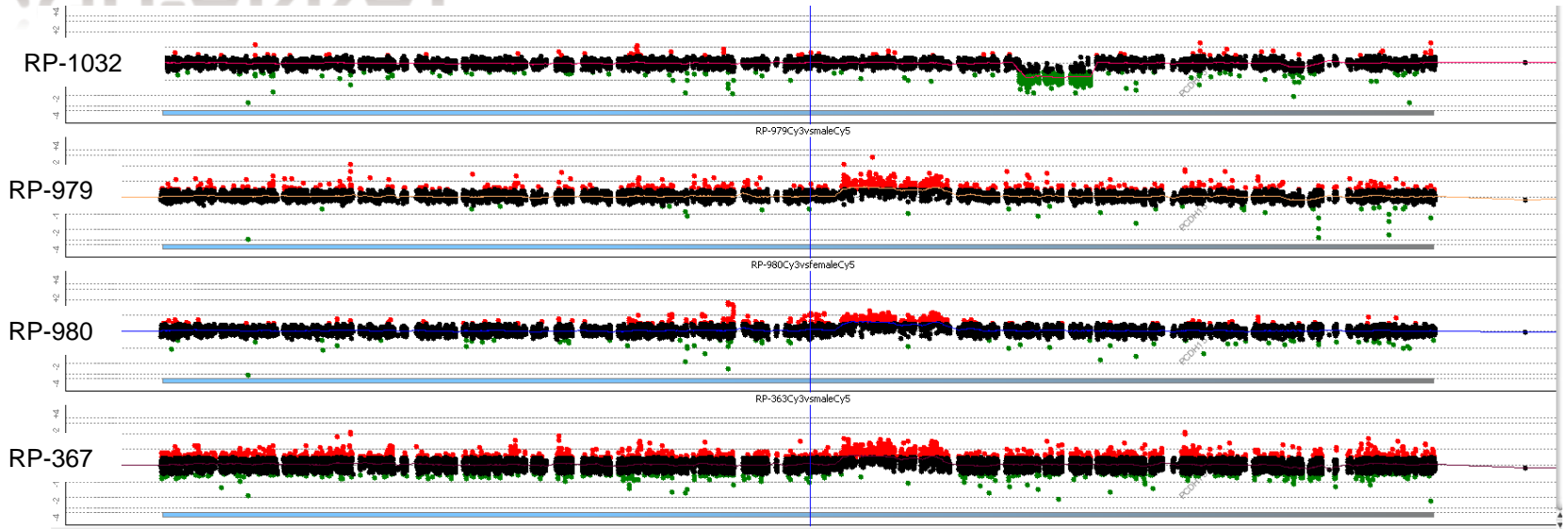


Diseño de un array de oligonucleótidos de 60 nt solapantes cubriendo todo el ADN genómico de *PCDH15* (a excepción de las regiones altamente repetitivas)

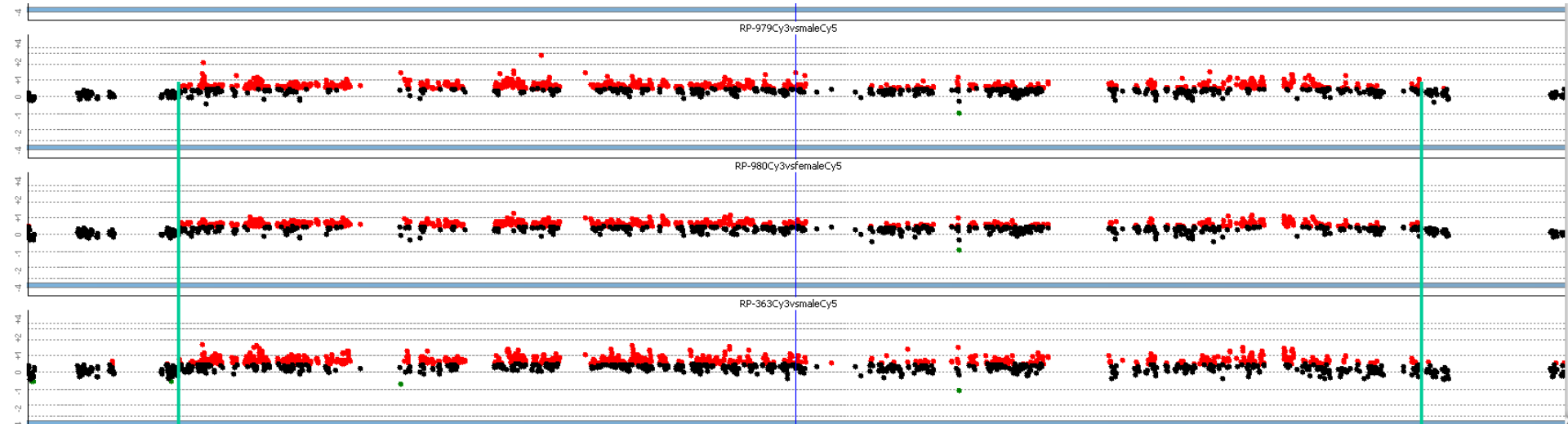


Aplicado al estudio del ADN genómico de:
RP-1034 (heterocigoto para delección exón3)
RP-367 (heterocigoto duplicación exones 4-6)
Padres de RP-982 (heterocigotos duplicación exones 4-6)

CGH-ARRAY



PUNTOS DE ROTURA DE LA DUPLICACIÓN

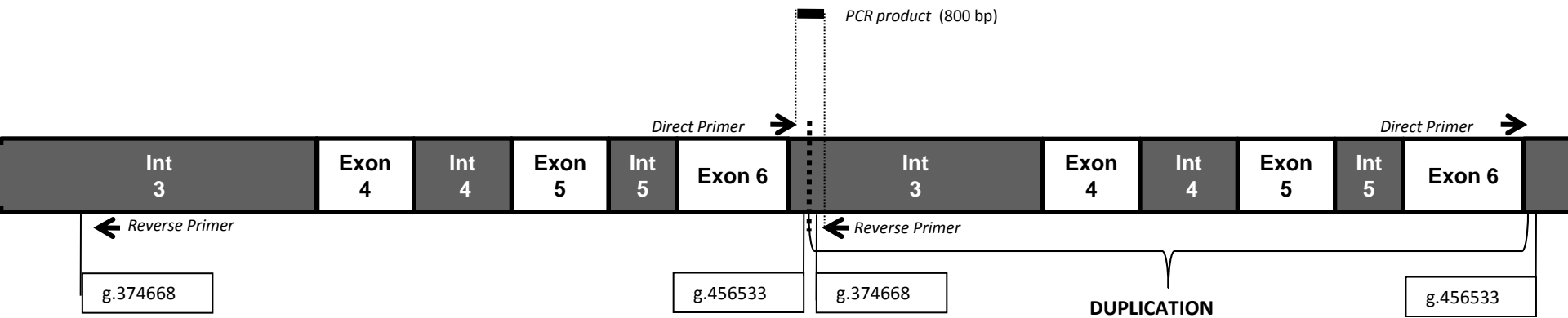


Final de la duplicación

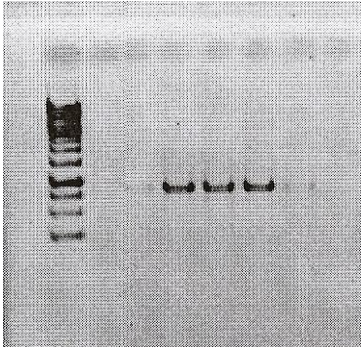
Inicio de la duplicación

PUNTOS DE ROTURA DE LA DUPLICACIÓN

HIPÓTESIS:
Duplicación directa, *in situ*

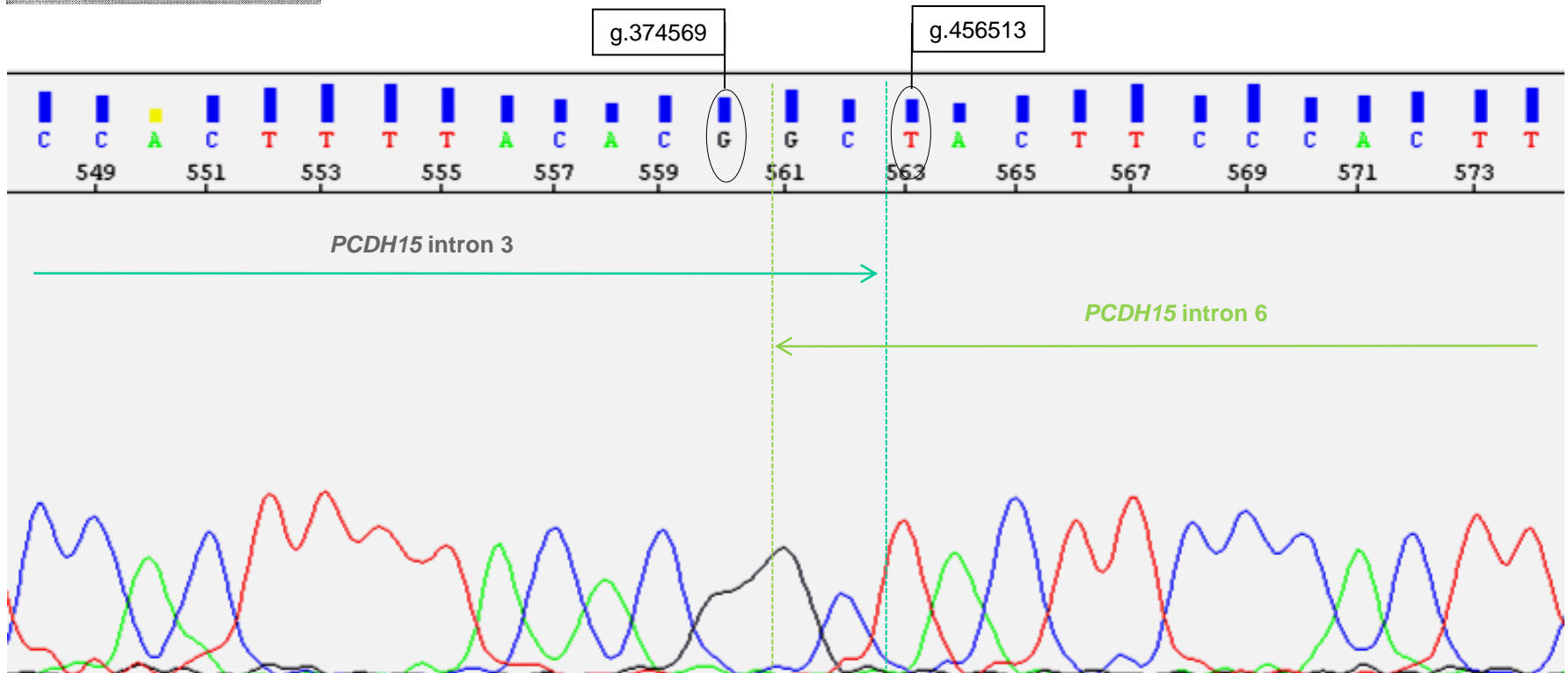


PUNTOS DE ROTURA DE LA DUPLICACIÓN



← Amplificado de 800 pb

Duplicación directa, *in situ*, de 81944 nt



Los a-APEX y los aCGH no sirven
para la mayoría de las
enfermedades genéticamente
heterogéneas

- Causadas por mutaciones puntuales o pequeñas deleciones e inserciones
- La mayoría de las mutaciones son exclusivas de una familia

Arrays Farmacogenómica

Genotipado: PHARMAchip (*Progenika*)

Microarray baja densidad (sondas alelo-especificas fijadas al porta)

90 Polimorfismos (SNPs/indel) en 36 genes implicados en FG

Muestra

449 controles españoles

Validez analítica: (Sensibilidad y Especificidad)

CYP2D6 PCR a tiempo real

SLC6A4 Electroforesis capilar

Gold Standard: Secuenciación automática

Validez clínica : (Sensibilidad y Especificidad y Valor Predictivo Positivo)

Fenotipos definidos de acuerdo a un “activity score”

(*Gaedigk et al., 2008*).

Frecuencias genotípicas y alélicas

(Test X^2 ; Test exacto de Fisher para alelos con una frecuencia <5%).

Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). ($p^2+2pq+q^2 = 1$)



RESULTADOS:

Validez clínica de CYP2D6

Fenotipos metabolizador lento (PM) y metabolizador ultra rápido (UM)

Sensibilidad, Especificidad y VPP: elevados

VALIDEZ CLINICA para CYP2D6

FENOTIPO	Genotipos analizados (n)	Sensibilidad	n	Especificidad	n	VPP
Metabolizador lento (PM)	71	83.3%	5/6	100%	65/65	100%
Metabolizador Ultrarapido (UM)	71	100%	6/6	100%	65/65	100%

CONCLUSIONES

1. Alta Validez analítica y clínica

2. Útil en Casos en Politerapia con

- *Riesgo vital dependiente de respuesta (eficacia): Psiquiatría, oncología-*
- *Riesgo vital dependiente de toxicidad (seguridad)*
- *Alto coste económico* (fármacos biológicos, etc)

INCONVENIENTES

➤ Interpretación de los resultados:

muchos datos no útiles de modo inmediato

Dificultad para el clínico

➤ Estudio FG-dosis-respuesta ¿?

➤ Estudio coste-efectividad ¿?

SNP-Arrays e investigación

Affymetrix 500K

2 arrays de 250,000 SNPs

- Oligos que detectan SNPs
- CNV por “intensidad señal de la sonda” sin hacer hibridación genómica

Affymetrix 6.0

- 900,000 Sondas para detección de SNPs
- 900,000 Sondas para detección de CNVs

Illumina 6K (Linkage)

- 6,090 SNPs
 - Oligos para detección de SNPs
- 1 SNP/ 441 Kb

• Illumina 300K

- 300,000 SNPs
- Oligos para detección de SNPs

Illumina Citogenetica 200K, 660K, 1M

- De 200,000 a 1,200,000 SNPs
- Oligos para detección de SNPs y CNVs

Genes candidatos // Nuevos Genes
Regiones de homocigosidad:

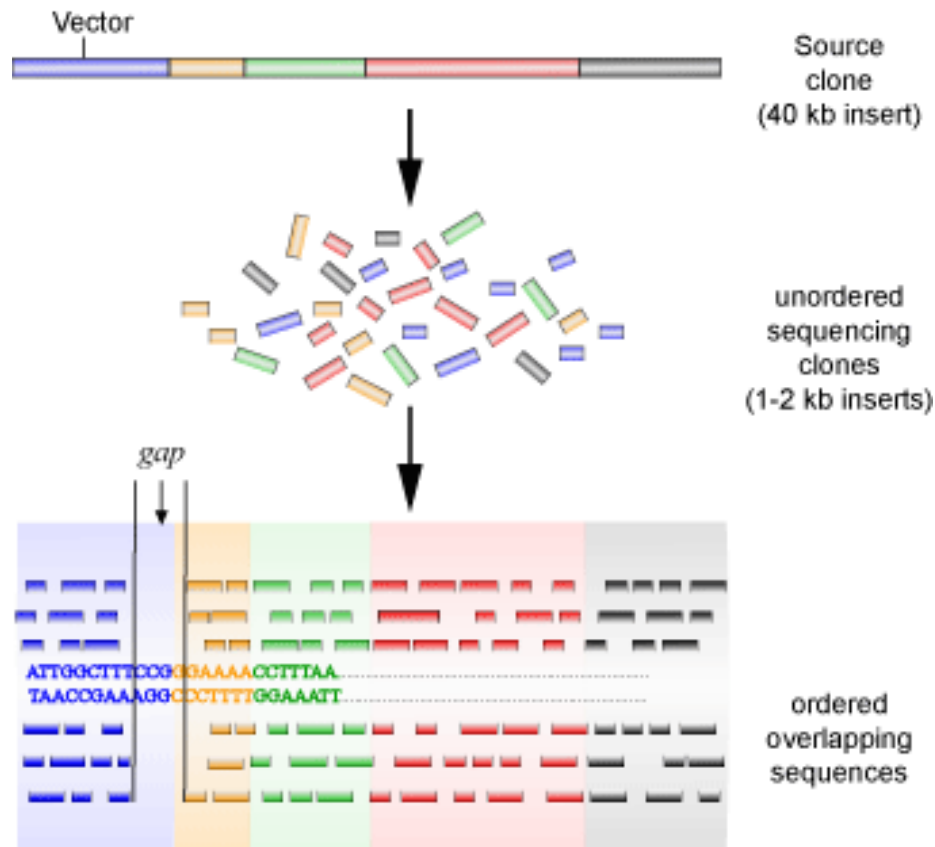
**Utilidad para Genome-Wide
Association Studies (GWAS)**

Estrategia NGS (Futuro)

- El Futuro: Next Generation Sequencing (NGS)
 - Exome Enrichment of genes and Massive Sequencing
 - Hace falta diseñar un algoritmo respecto a los genes que se han de secuenciar según el tipo de RD y evitar resultados redundantes y no deseados.
 - El cuello de botella: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO
(¡¡URGENTE!!)

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Shotgun Sequencing



Published in final edited form as:

J Genet Genomics. 2011 March 20; 38(3): 95–109. doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003.

The impact of next-generation sequencing on genomics

Jun Zhang^{a,b,*}, Rod Chiodini^c, Ahmed Badr^a, and Genfa Zhang^d

3. Next-generation sequencing platforms under development

Since single DNA molecule sequencing technology can read through DNA templates in real time without amplification, it provides accurate sequencing data with potentially long-reads and efforts have focused recently in this new direction. Several unique single-molecule DNA sequencing technologies are currently under development; however, little information has been made publically available (Gupta, 2008; Xu et al., 2009; Metzker, 2010; Treffer and Deckert, 2010).

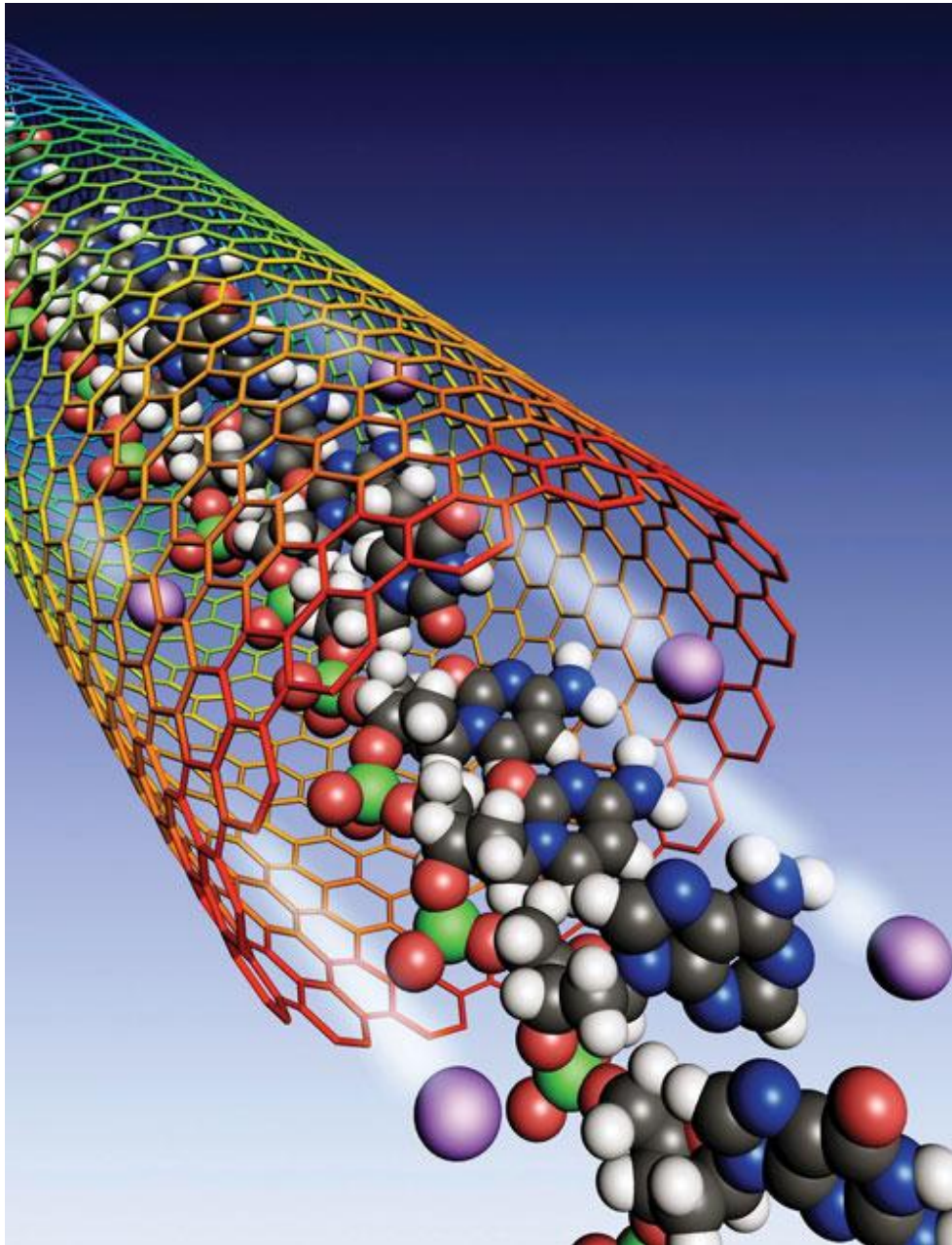
3.1. Fluorescence-based single-molecule sequencing

Pacific BioSciences is developing a single-molecule real time (SMRT) DNA sequencing technology. This approach performs single-molecule sequencing by identifying nucleotides which are phospholinked with distinctive colors. During the synthesis process, fluorescence emitted as the phosphate chain is cleaved and the nucleotide is incorporated by a polymerase into a single DNA strand.

Next-Generation Sequencing Moves to Next-Next Level

Richard A. Stein, M.D., Ph.D.

As Technology Proves Its Mettle and Advances Expand Usage, Applications Are Proliferating



- DNA and ions exit a carbon nanotube that can act as a combined nanopore and electrode for DNA sequencing. [Hao Liu/ASU]



Estudio clásico

- Secuenciación de un gen – 300-2.000 €

Análisis por Array

- Panel de mutaciones conocidas – 300 -600 €
- SNP arrays – 300 - 600 €

NGS:

- Secuenciación “customizada” – 1,000-2.000 €
Paneles de 40 a 100 genes (1 a 10Mb)
- Secuenciación exoma – 4.500 €/individuo

Whole-Genome Sequencing in a Patient with Charcot–Marie–Tooth Neuropathy

Table 2. SNPs Identified through Whole-Genome Sequencing of DNA from the Proband.*

SNP Type	No. of SNPs
Nongene	2,255,102
Gene	1,165,204
Intron	1,064,655
Promoter	60,075
3' UTR	16,350
5' UTR	3,517
Splice regulatory site	2,089
Splice site	112
Synonymous	9,337
Stop→stop	17
Nonsynonymous	9,069
Stop→gain	121
Stop→loss	27
Total	3,420,306

Table 4. Disease and Trait Associations of Nonsynonymous SNPs Identified in the Proband, According to the Human Gene Mutation Database.*

Disease or Trait Associated with Mutation	SNPs <i>no. (%)</i>
Total	159 (100)
Behavioral disorder	6 (4)
Cancer	33 (21)
Association	7
Increased risk	9
Reduced risk	3
Susceptibility	14
Complex disease	48 (30)
Mendelian disease	21 (13)
Metabolic trait	17 (11)
Pharmacogenetic trait	14 (9)
Other traits	20 (13)



GEN ÉTICA



Autonomía (no dirigida), Justicia,
Beneficencia y no Maleficencia

Incorrecta interpretación de los resultados

Aparición de resultados inesperados o no
deseados

Desprotección del menor

Los Diagnósticos Genéticos deben ser considerados como:

Cualquier otro test diagnóstico:

- Validez analítica
- Validez clínica
- Utilidad clínica

Características Peculiares

- Datos Permanentes (excepto mutaciones somáticas)
- Pueden afectar a otras personas (familiares)
- Pueden predecir una enfermedad
- Difícil interpretación

Los datos genéticos personales objeto de protección especial:

Confidencialidad y No Discriminación

Respeto a dignidad de las personas y derechos individuales

Situaciones Especiales

Estudios Predictivos

Voluntario / CI / Consejo Genético

Estudios en Menores ó Incapaces:

Autorización Tutor o Rpte legal

Sólo si existe beneficio para el sujeto o para la investigación (y sin riesgos)

RIESGOS (Reales y Percibidos) de un ESTUDIO/ INVESTIGACIÓN GENÉTICA

Poder de identificación del sujeto fuente: Discriminación

Usos Distintos a los iniciales / Información no buscada: Autonomía

Solo si incluye todo el genoma o marcadores de significado incierto

- Rasgos genéticos no asociados a salud: talla, inteligencia longevidad, color ojos
- Paternidad
- Factores genéticos de predisposición a otras enfermedades

Dificultad en la interpretación de los resultados

- Replicación en otros estudios
- Riesgo relativo (OR) bajo
- Valor exclusivamente poblacional no individual

Implicación para los familiares

REQUISITOS - RECOMENDACIONES

Controles de Calidad y Regulación Legal (confidencialidad, menores)

Consejo genético

Consentimiento informado

Comités Éticos

CONCLUSIONES

- Asistencia e Investigación:
 - Las nuevas tecnologías facilitan el diagnóstico molecular y el descubrimiento de nuevos genes y dianas terapéuticas
 - Se pueden obtener resultados inesperados o no deseados
 - Consentimiento informado
 - Asesoramiento genético

CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA: CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA PORCINA

Trabajo final de carrera – Licenciatura Biotecnología

Cristina Martínez Fernández de la Cámara

Directora académica: Regina Rodrigo Nicolás.

Enfermedades Neurosensoriales, IIS-La Fe.

Valencia, Septiembre 2011

Gracias por vuestra atención

