

<https://medicinaprecisionandalucia.iavante.es> | #PANMEP

PANMEP

PROGRAMA ANDALUZ DE FORMACIÓN EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

EXPERTO UNIVERSITARIO EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

ORGANIZAN:

- **Consejería de Salud y Consumo**, Fundación Progreso y Salud - IAVANTE
- **Universidad Internacional de Andalucía**

FORMACIÓN
IAVANTE
Fundación
Progreso y Salud

Dr. Michele Biscuola

Director Laboratorio Patología Molecular
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Virgen del Rocío

COLABORA

Johnson & Johnson

ORGANIZAN

un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A

A
Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

TYPES OF MUTATIONS

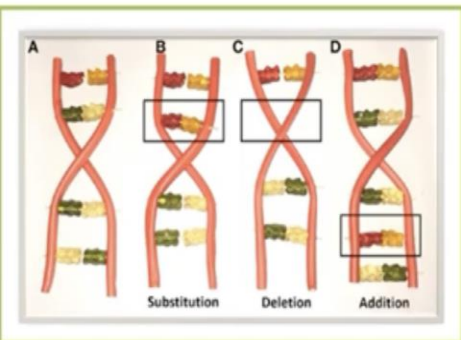


TYPES OF MUTATIONS



At the DNA level

- ☐ Substitutions
- ☐ Deletions
- ☐ Insertions

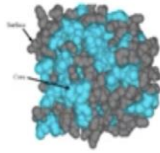


TYPES OF MUTATIONS



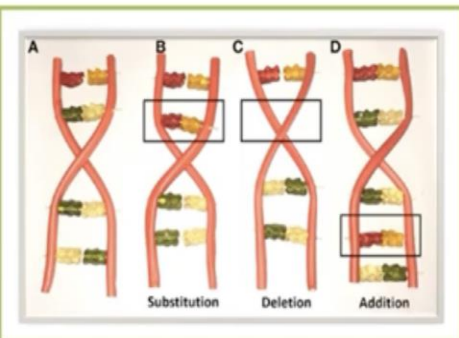
At the DNA level

- ☐ Substitutions
- ☐ Deletions
- ☐ Insertions



At Protein level

- ☐ Silent mutations
- ☐ Missense mutations
- ☐ Nonsense mutations
- ☐ Frameshift deletion mutations
- ☐ Frameshift insertion mutations



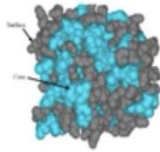
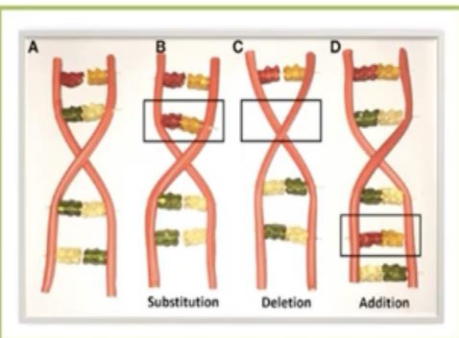
	No mutation	Point mutations			
		Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr

TYPES OF MUTATIONS



At the DNA level

- ☐ **Substitutions**
- ☐ **Deletions**
- ☐ **Insertions**



At Protein level

- ☐ **Silent mutations**
- ☐ **Missense mutations**
- ☐ **Nonsense mutations**
- ☐ **Frameshift deletion mutations**
- ☐ **Frameshift insertion mutations**

	Point mutations				
	No mutation	Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr

In molecular genetics

- ☐ **Neutral**
- ☐ **Non-neutral**

Chromosome mutations

- ☐ **Structural mutations**
 - Deletions
 - Duplications
 - Inversions
 - Insertions
 - Translocations
- ☐ **Numerical mutations**
 - Polyploidy
 - Aneuploidy

TYPES OF MUTATIONS

SNV

SV

At the DNA level

- ☒ Substitutions
- ☐ Deletions
- ☐ Insertions

At Protein level

- ☒ Silent mutations
- ☐ Missense mutations
- ☐ Nonsense mutations
- ☐ Frameshift deletion mutations
- ☐ Frameshift insertion mutations

In molecular genetics

- ☒ Neutral
- ☐ Non-neutral

Chromosome mutations

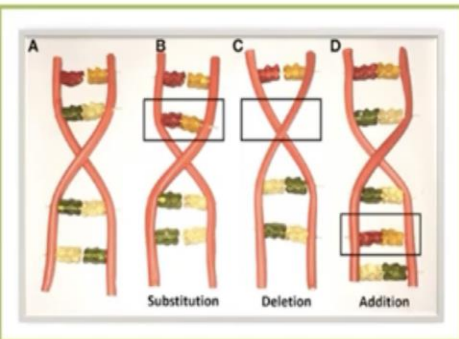
☐ Structural mutations

- Deletions
- Duplications
- Inversions
- Insertions
- Translocations

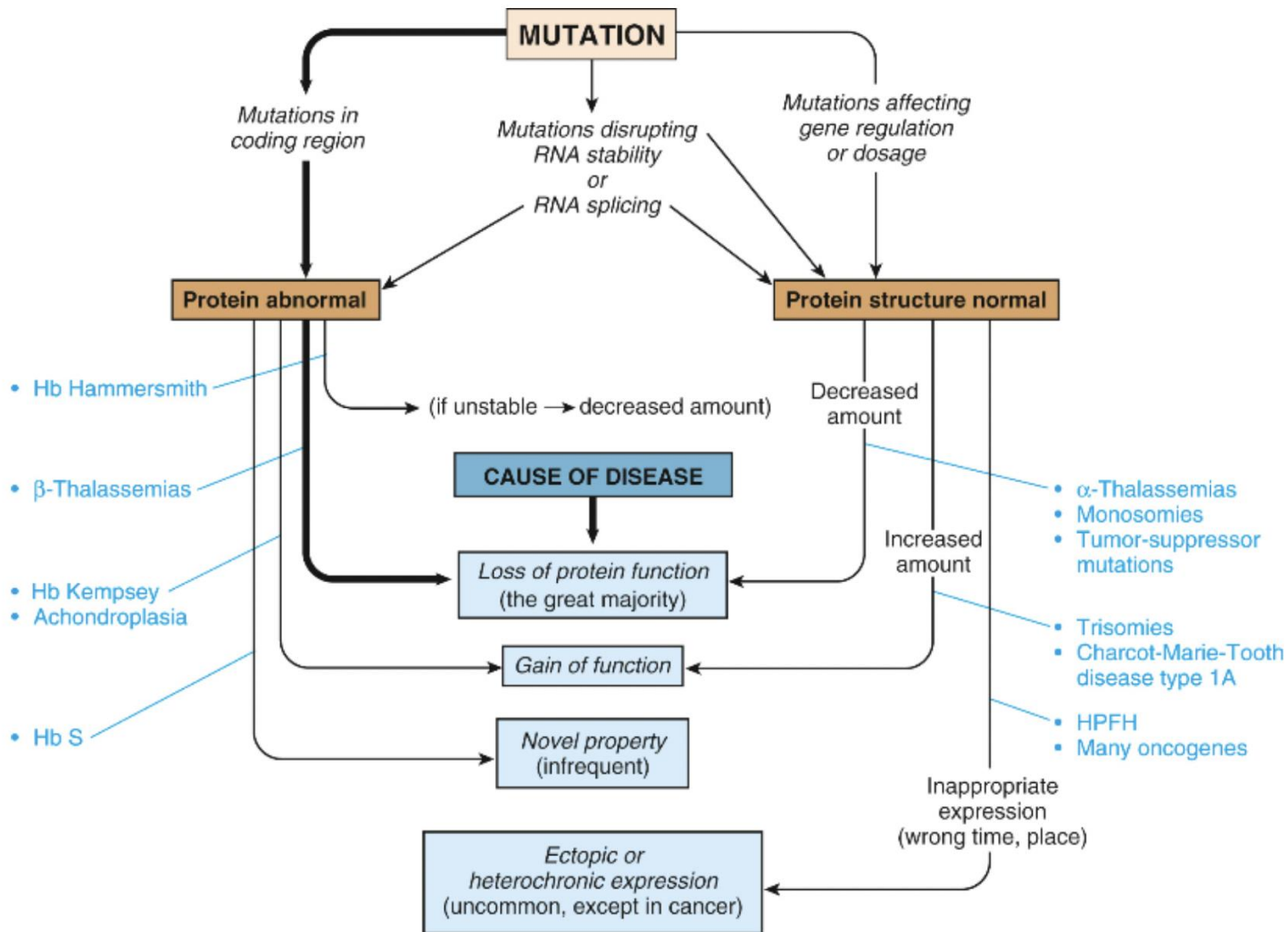
☐ Numerical mutations

- Polyploidy
- Aneuploidy

CNV



	Point mutations				
	No mutation	Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr



Terminología

- **SNV**

Terminología

- **SNV** (Single Nucleotide Variant): se producirá un cambio de un único nucleótido

Terminología

- **SNV** (Single Nucleotide Variant): se producirá un cambio de un único nucleótido
- **MNV**

Terminología

- **SNV** (Single Nucleotide Variant): se producirá un cambio de un único nucleótido
- **MNV** (Multi Nucleotide Variant): se producirá un cambio de más de un nucleótido

Terminología

- **SNV** (Single Nucleotide Variant): se producirá un cambio de un único nucleótido
- **MNV** (Multi Nucleotide Variant): se producirá un cambio de más de un nucleótido
- **InDel**:

Terminología

- **SNV** (Single Nucleotide Variant): se producirá un cambio de un único nucleótido
- **MNV** (Multi Nucleotide Variant): se producirá un cambio de más de un nucleótido
- **InDel**: inserciones o deleciones de nucleótidos de tamaño inferior a las 1000 pb

Terminología

- **CNA/CNV**

Terminología

- **CNA/CNV** (Copy Number Alteration/Copy Number Variant):
 - Alteración en el número de copias de una región de un gen, de todo el gen, de genes contiguos y de regiones cromosómicas
 - Incluyen las deleciones (número de copias inferior a 2, tamaño superior a 1kb) y las duplicaciones, ganancias, amplificaciones (número de copias superior a 2)

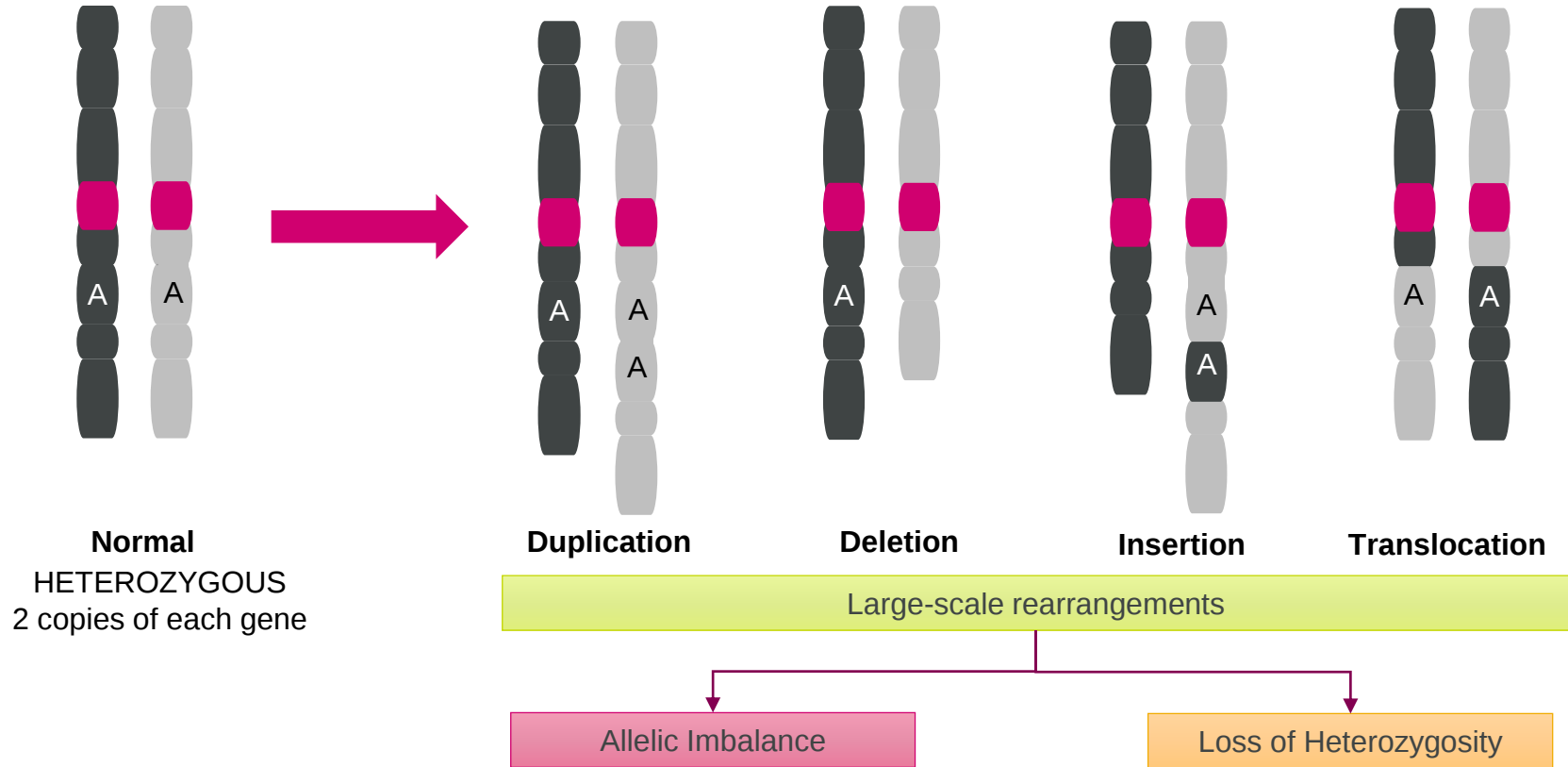
Terminología

- **SV**

Terminología

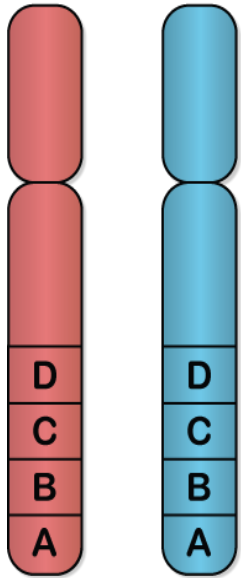
- **SV** (Structural Variant):
 - Variantes que alteran la estructura y orden normal de una o algunas regiones cromosómicas, de un brazo de uno o más cromosomas
 - Incluyen traslocaciones, fusiones, inserciones, inversiones
 - Las CNV se incluyen dentro de las variantes estructurales

Terminología



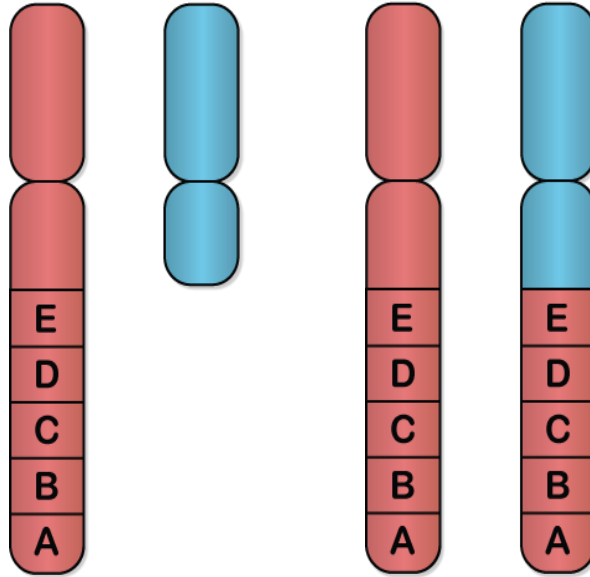
Pérdida de heterocigidad

Germline



Heterozygous

Tumour



Deletion
LOH

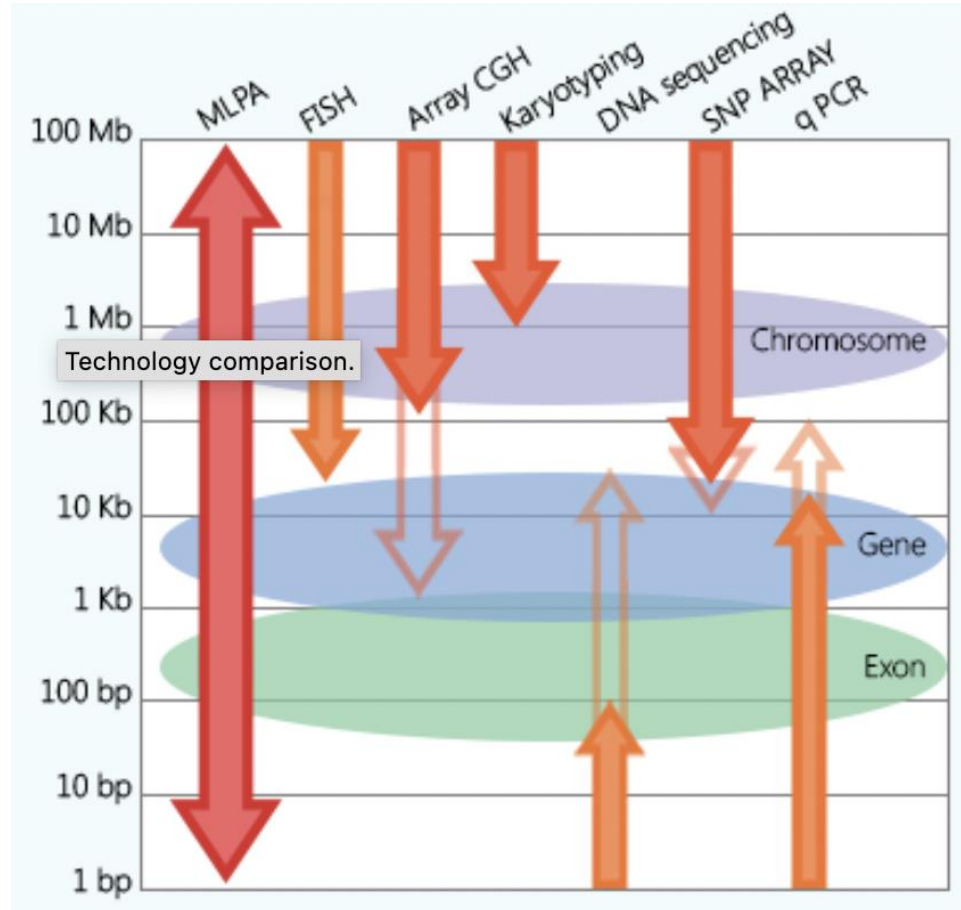
Copy number neutral
LOH

- Variación respecto al normal número de alelos en heterocigosis
 - <2 : pérdida de una o más regiones cromosómicas
 - >2 : duplicación de una o más regiones cromosómicas
- Comporta la transición desde un estado de heterocigosis presente en la línea germinal hacia un aparente estado de homocigosis

Fundamentos

- El número de nucleótidos involucrados en una alteración, determinará la herramienta molecular a usar
- Cada herramienta tiene su nivel de resolución

Resolución



Fundamentos

- El número de nucleótidos involucrados en una alteración, determinará la herramienta molecular a usar
- Cada herramienta tiene su nivel de resolución
- Para una determinada alteración, podemos usar una o más herramientas
- Cada una de ellas tendrá su propia sensibilidad, especificidad y límite de detección
- El tipo de muestra de partida tendrá un papel fundamental en la elección de la herramienta molecular

Alteración	Herramienta	Observaciones

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • I^a, II^a, III^a generación • Sondas diferentes • Cribado

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • I^a, II^a, III^a generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • NGS • Cariotipo	

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • I^a, II^a, III^a generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • NGS • Cariotipo	• FISH, CISH, SISH • Definir regiones • Resolución • DNA • Interpretación

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • I^a, II^a, III^a generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • NGS • Cariotipo	• FISH, CISH, SISH • Definir regiones • Resolución • DNA • Interpretación
SV	• ISH • NGS • Cariotipo	

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • I^a, II^a, III^a generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • NGS • Cariotipo	• FISH, CISH, SISH • Definir regiones • Resolución • DNA • Interpretación
SV	• ISH • NGS • Cariotipo	• FISH • DNA y RNA • Interpretación

Muestra

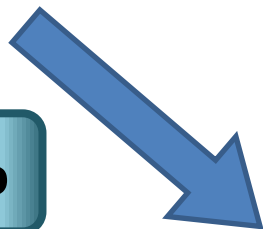
Germinal/Somático

Alteración

Nº alteraciones

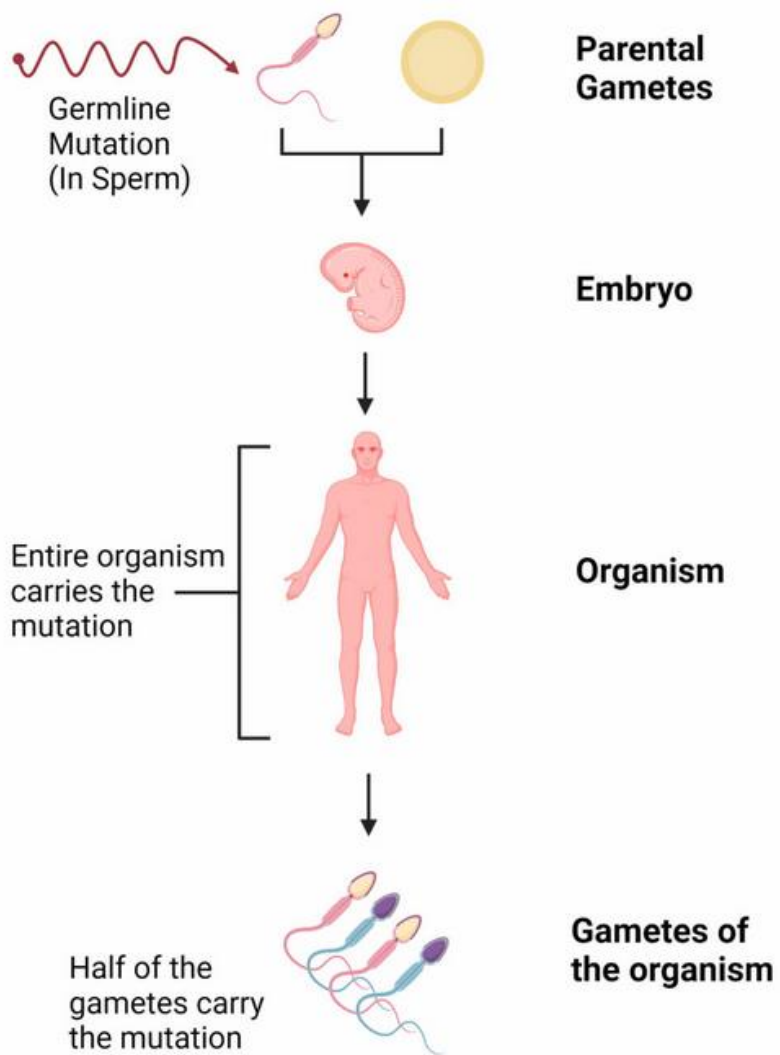
Herramienta

Tiempo de respuesta

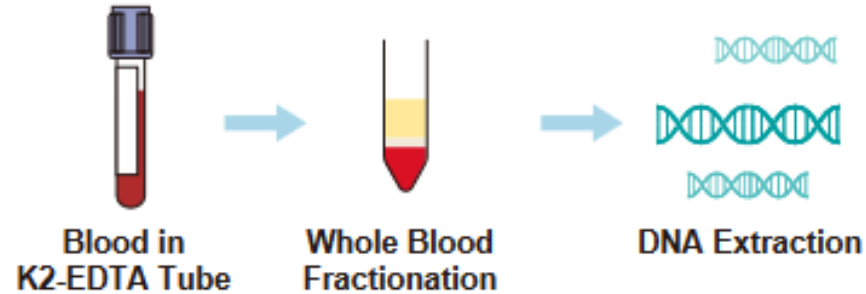


Muestra

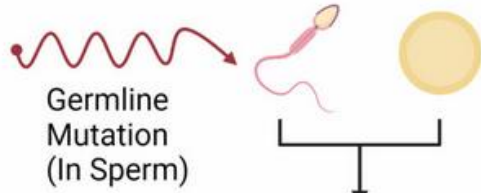
Germinal/Somático



Ventajas estudios líneas germinal



- **Facilidad de obtención**
 - **Integridad AA.NN.**
- **Cantidad/concentración**



**Parental
Gametes**



Embryo

Entire organism
carries the
mutation

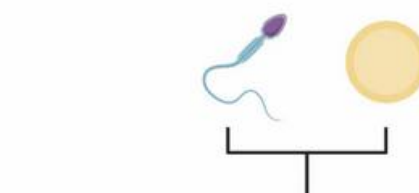


Organism

Half of the
gametes carry
the mutation



**Gametes of
the organism**

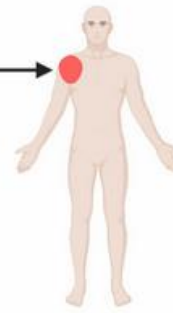


**Parental
Gametes**



Embryo

Patch of the
affected area



Organism

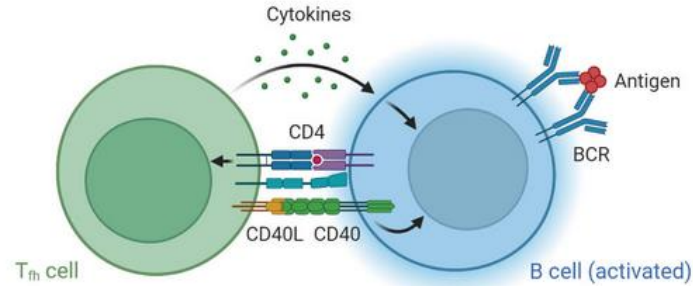
None of the
gametes carry
the mutation



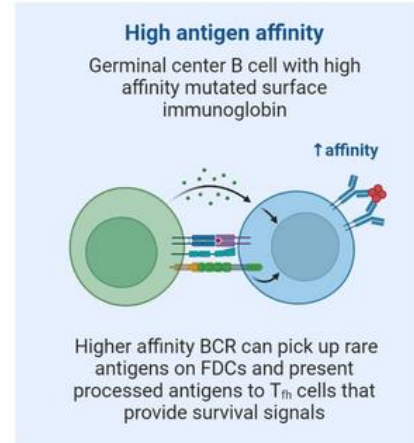
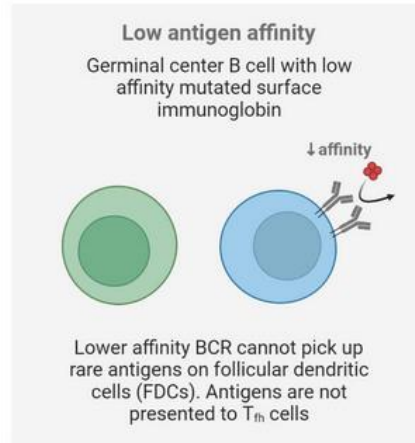
**Gametes of
the organism**

Somatic Hypermutation in Germinal Center B Cells Generate New BCRs

1. B cell activation



2. Somatic hypermutation of immunoglobulin V regions in rapidly proliferating germinal center B cells



A body-wide view of somatic mutations

NATURE REVIEWS | **GENETICS** | VOLUME 22 | NOVEMBER 2021 | 689



Article

A body map of somatic mutagenesis in morphologically normal human tissues

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03836-1>

Received: 29 November 2020

Accepted: 20 July 2021

Published online: 25 August 2021

Ruoyan Li^{1,2,3,4}, Lin Di^{1,2,3,4}, Jie Li^{3,4,5,6}, Wenyi Fan^{5,6,7,8,9,10}, Yachen Liu⁵, Wenjia Guo⁵, Weiling Liu⁵, Lu Liu^{1,2}, Qiong Li^{3,4,5}, Liping Chen⁵, Yamei Chen⁵, Chuanwang Miao⁵, Hongjin Liu⁵, Yuqian Wang⁵, Yuling Ma⁵, Deshu Xu^{1,2}, Dongxin Lin^{5,6,7,8,9,10}, Yanyi Huang^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}, Jianbin Wang^{3,4,5,6,7,8,9,10}, Fan Bai^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10} & Chen Wu^{5,6,7,8,9,10} 

Article

The mutational landscape of human somatic and germline cells

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03822-7>

Received: 23 November 2020

Accepted: 13 July 2021

Published online: 25 August 2021

 Check for updates

Luiza Moore^{1,2,3}, Alex Cagan^{1,3}, Tim H. H. Coorens^{1,3}, Matthew D. C. Neville¹, Rakesh Sanghvi¹, Mathijs A. Sanders^{1,3}, Thomas R. W. Oliver^{1,2}, Daniel Leongamornlert¹, Peter Ellis^{1,2}, Ayesha Noorani¹, Thomas J. Mitchell^{1,4}, Timothy M. Butler¹, Yvette Hooks¹, Anne Y. Warren², Mette Jorgensen⁵, Kevin J. Dawson¹, Andrew Menzies¹, Laura O'Neill¹, Calli Latimer¹, Mabel Teng¹, Ruben van Bostel¹, Christine A. Iacobuzio-Donahue^{2,6}, Inigo Martincorena¹, Rakesh Heer^{3,9}, Peter J. Campbell¹, Rebecca C. Fitzgerald¹, Michael R. Stratton^{1,2,3} & Raheleh Rahbari^{1,2,3} 

Article

The mutational landscape of human somatic and germline cells

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03822-7>

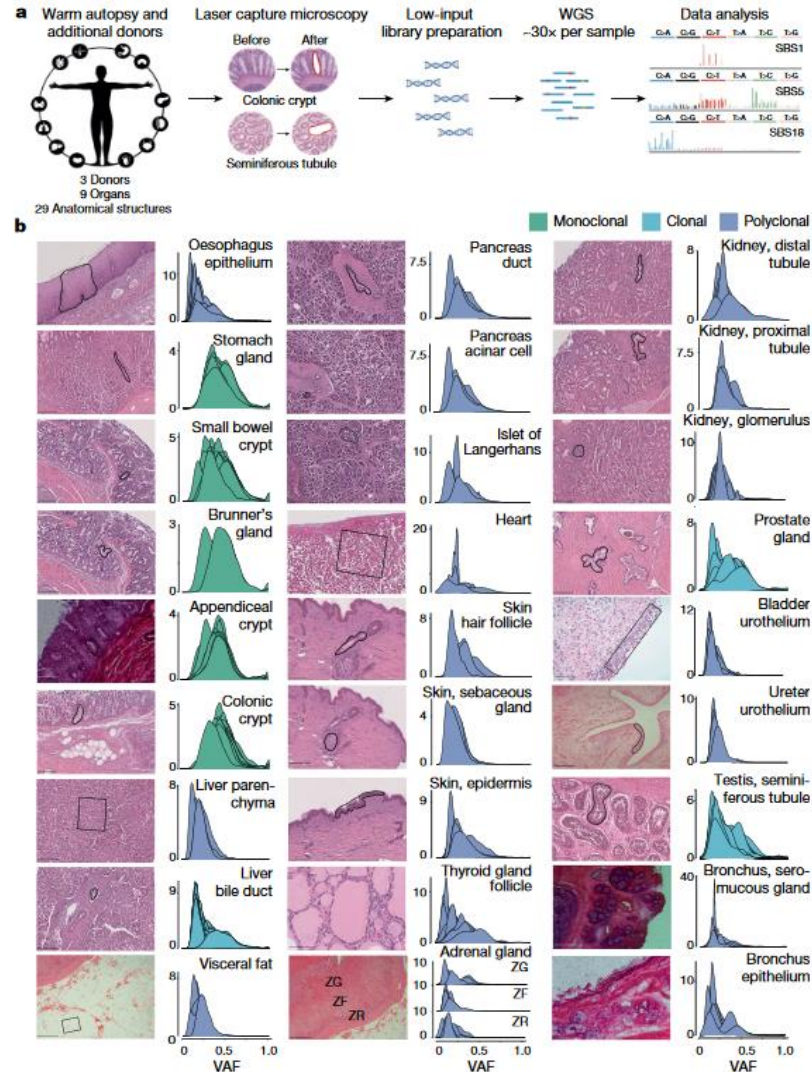
Received: 23 November 2020

Accepted: 13 July 2021

Published online: 25 August 2021

Check for updates

Luiza Moore^{1,2,3}, Alex Cagan^{1,2}, Tim H. H. Coorens^{1,2}, Matthew D. C. Neville¹, Rashesh Sanghvi¹, Mathijs A. Sanders^{1,2}, Thomas R. W. Oliver^{1,2}, Daniel Leongamornlert¹, Peter Ellis^{1,2}, Ayesha Noorani¹, Thomas J. Mitchell^{1,4}, Timothy M. Butler¹, Yvette Hooks¹, Anne Y. Warren², Mette Jorgensen⁵, Kevin J. Dawson¹, Andrew Menzies¹, Laura O'Neill¹, Calli Latimer¹, Mabel Teng¹, Ruben van Bostel⁶, Christine A. Iacobuzio-Donahue^{7,8}, Inigo Martincorena¹, Rakesh Heer^{9,10}, Peter J. Campbell¹, Rebecca C. Fitzgerald¹¹, Michael R. Stratton^{1,2} & Raheleh Rahbari^{1,2}



Article

A body map of somatic mutagenesis in morphologically normal human tissues

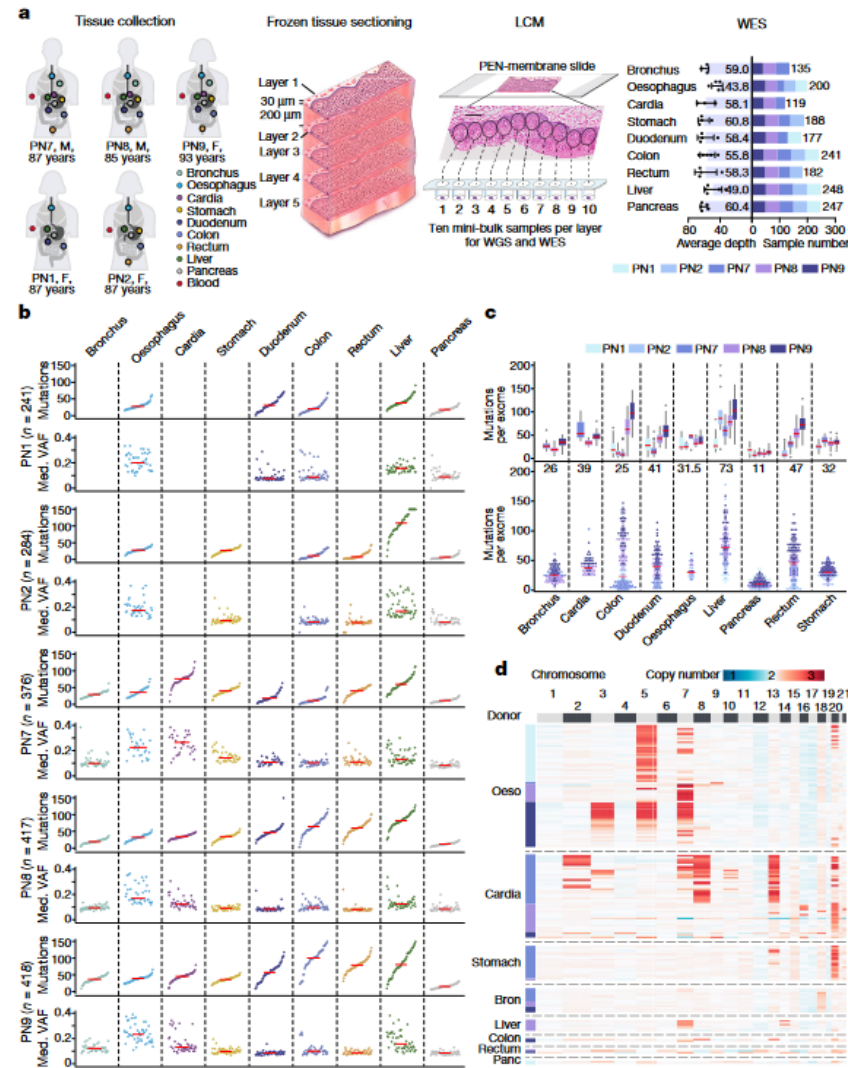
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03836-1>

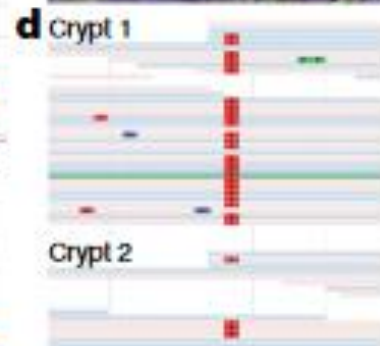
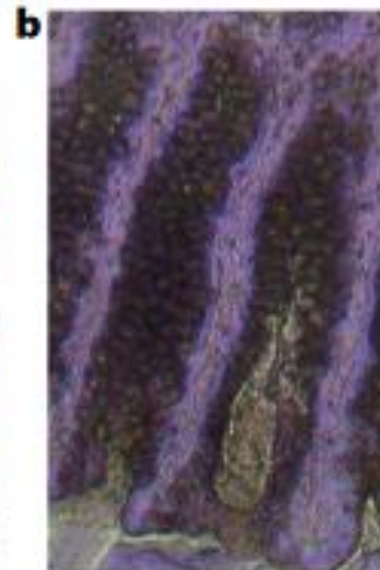
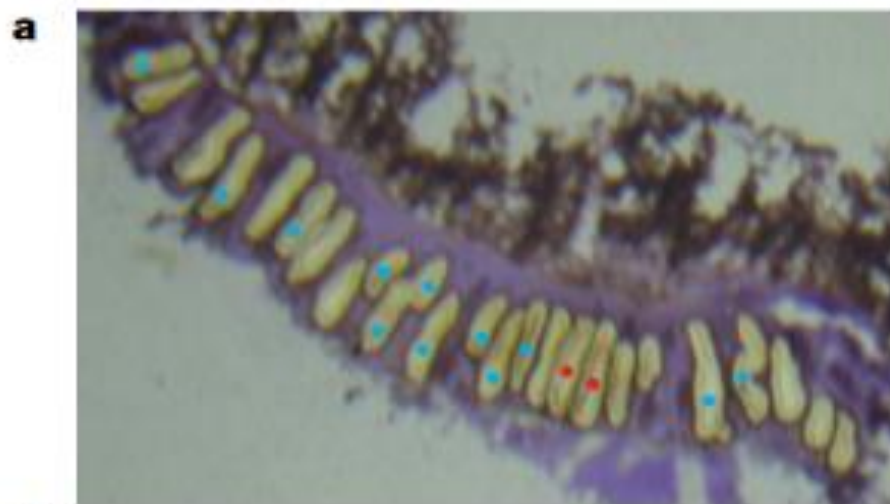
Received: 29 November 2020

Accepted: 20 July 2021

Published online: 25 August 2021

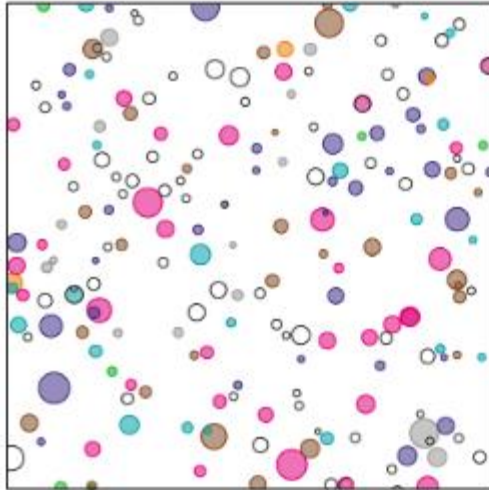
Ruoyan Li^{1,2,3,4}, Lin Di^{1,2,3,4}, Jie Li^{2,3,4,5,6}, Wenyi Fan^{5,14}, Yachen Liu⁵, Wenjia Guo⁵, Weiling Liu⁵, Lu Liu^{1,2}, Qiong Li^{1,2,4}, Liping Chen⁵, Yamei Chen⁵, Chuanwang Miao⁵, Hongjin Liu⁵, Yuqian Wang⁵, Yuling Ma⁵, Deshu Xu^{1,2}, Dongxin Lin^{5,6,7,8,9,10}, Yanyi Huang^{12,13,14,15}, Jianbin Wang^{3,4,15}, Fan Bai^{1,2,12,15} & Chen Wu^{5,6,8,12,15}✉



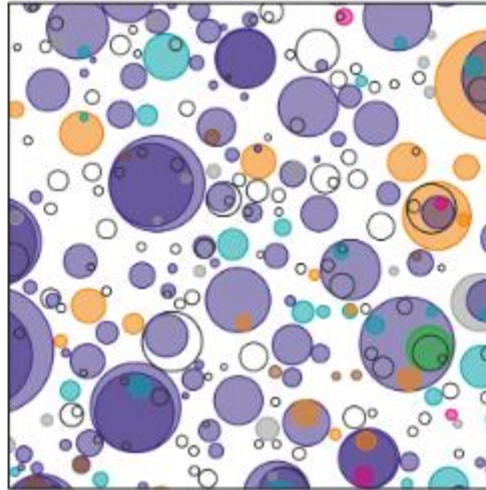


Article
The landscape of somatic mutation in
normal colorectal epithelial cells

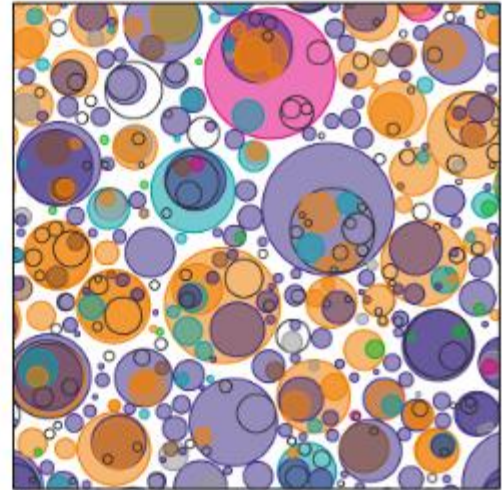
24–27 years old



52–55 years old



72–75 years old



TP53 NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 FAT1 ARID1A Other driver genes Other non-driver genes

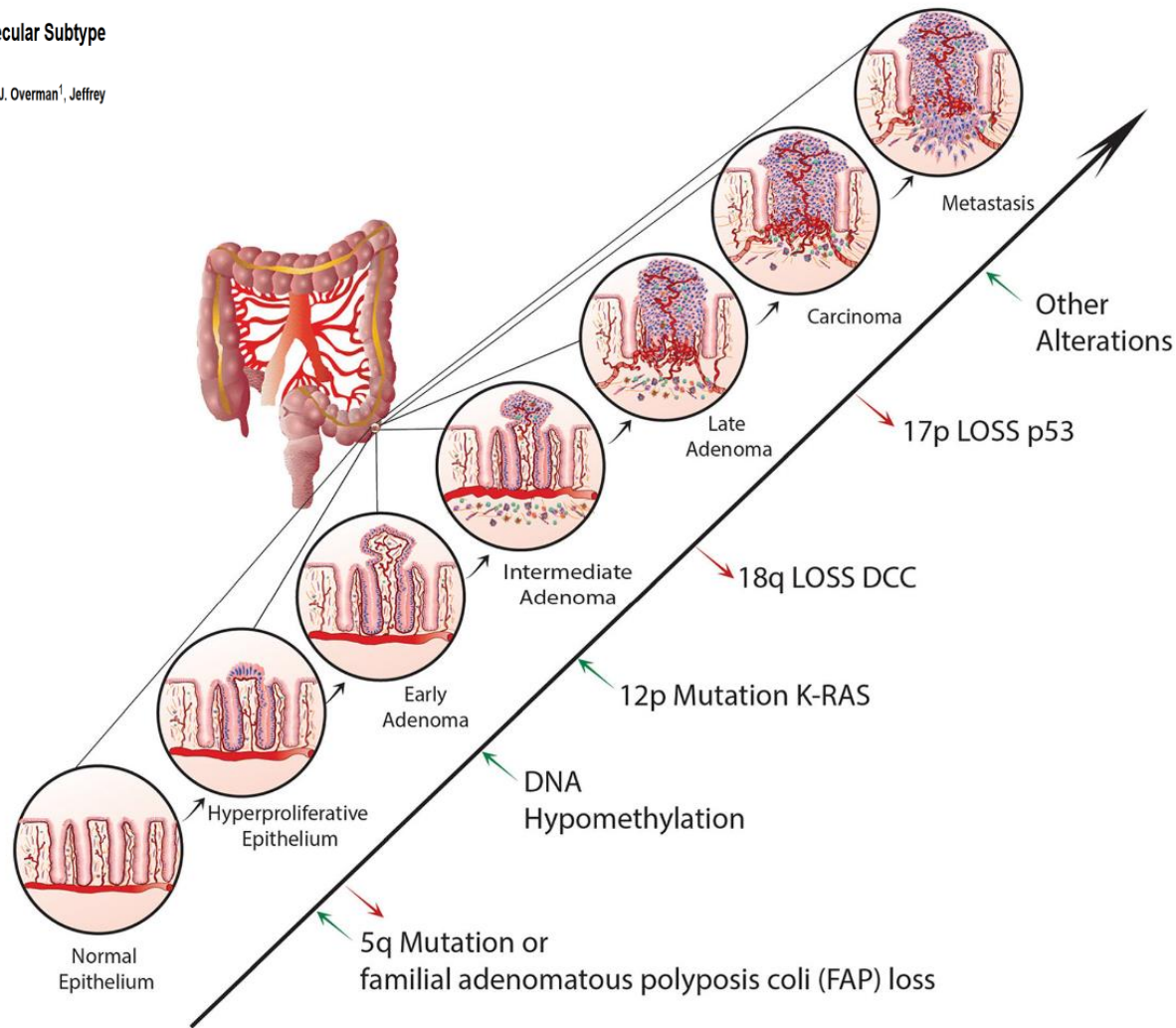
Fig. 1 Mutant cell colonization of healthy esophageal epithelium with age. Each panel is a schematic illustration of a representative 1 cm² area of normal esophagus from three donors. The younger donor was a moderate smoker and the two older donors were non-smokers. Mutant clones are shown as circles randomly distributed in space. The number of mutant clones and their sizes are directly inferred from the sequencing data, with clone areas being estimated from the fraction of sequencing reads carrying each mutation in each sample (adapted from [3])

Somatic mutation and clonal expansions in human tissues

Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype

Future

David G. Menter¹, Jennifer S. Davis², Bradley M. Broom³, Michael J. Overman¹, Jeffrey Morris², and Scott Kopetz¹



Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor

Problemas detección alteraciones somáticas



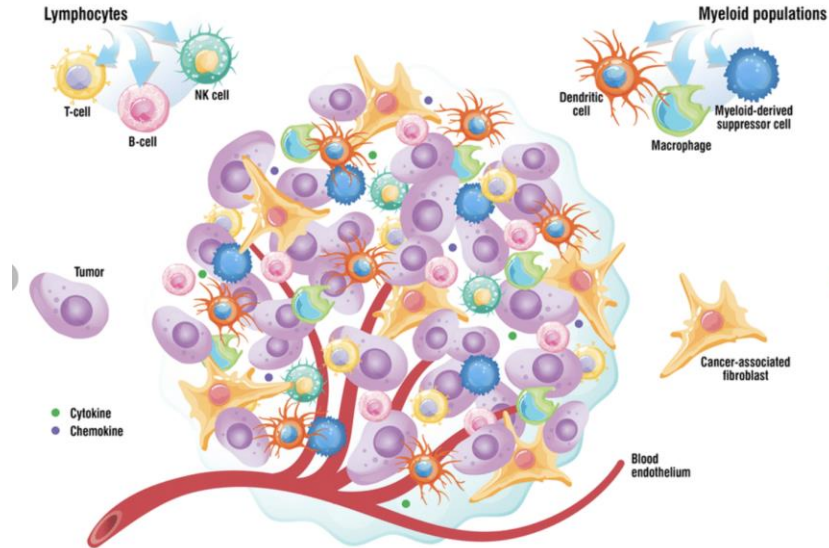
Tumor



“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Problemas detección alteraciones somáticas



“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor



“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor

“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

La muestra podría no incluir todas las clonas.

Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor



La muestra podría no incluir todas las clonas.

“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral



Cantidad de células clonales

Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor

“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

La muestra podría no incluir todas las clonas.

Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor



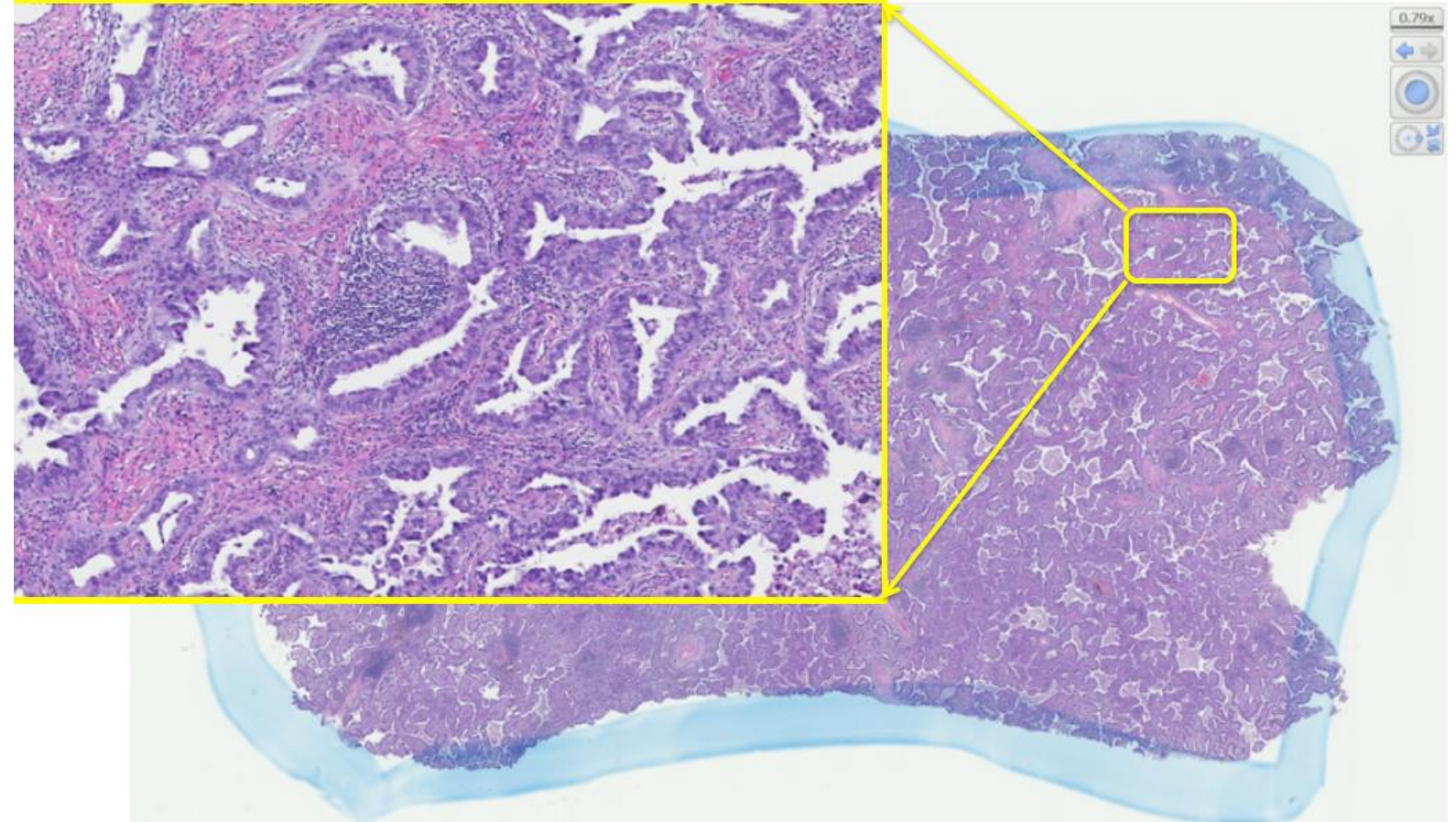
La muestra podría no incluir todas las clonas.

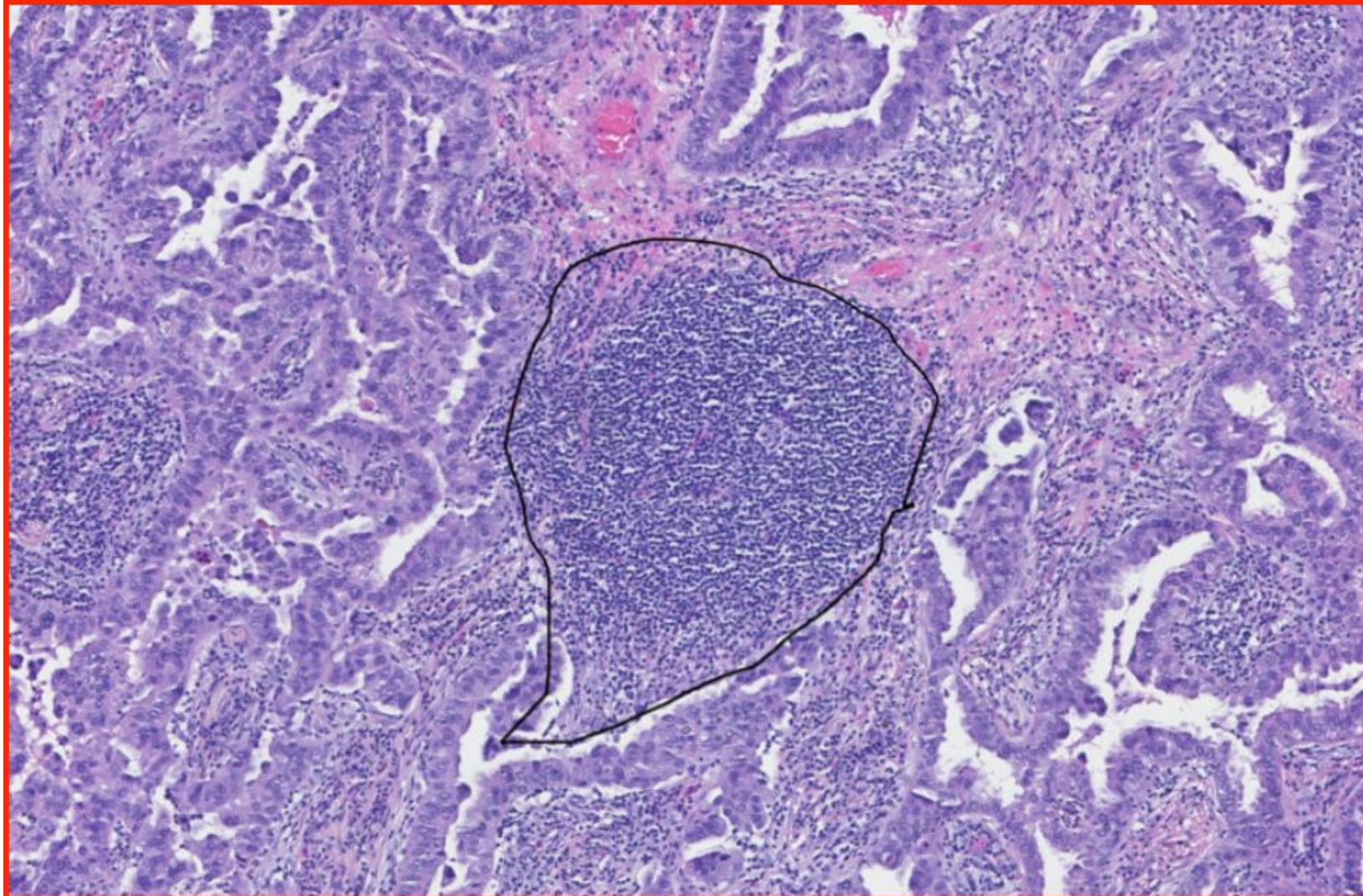
“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

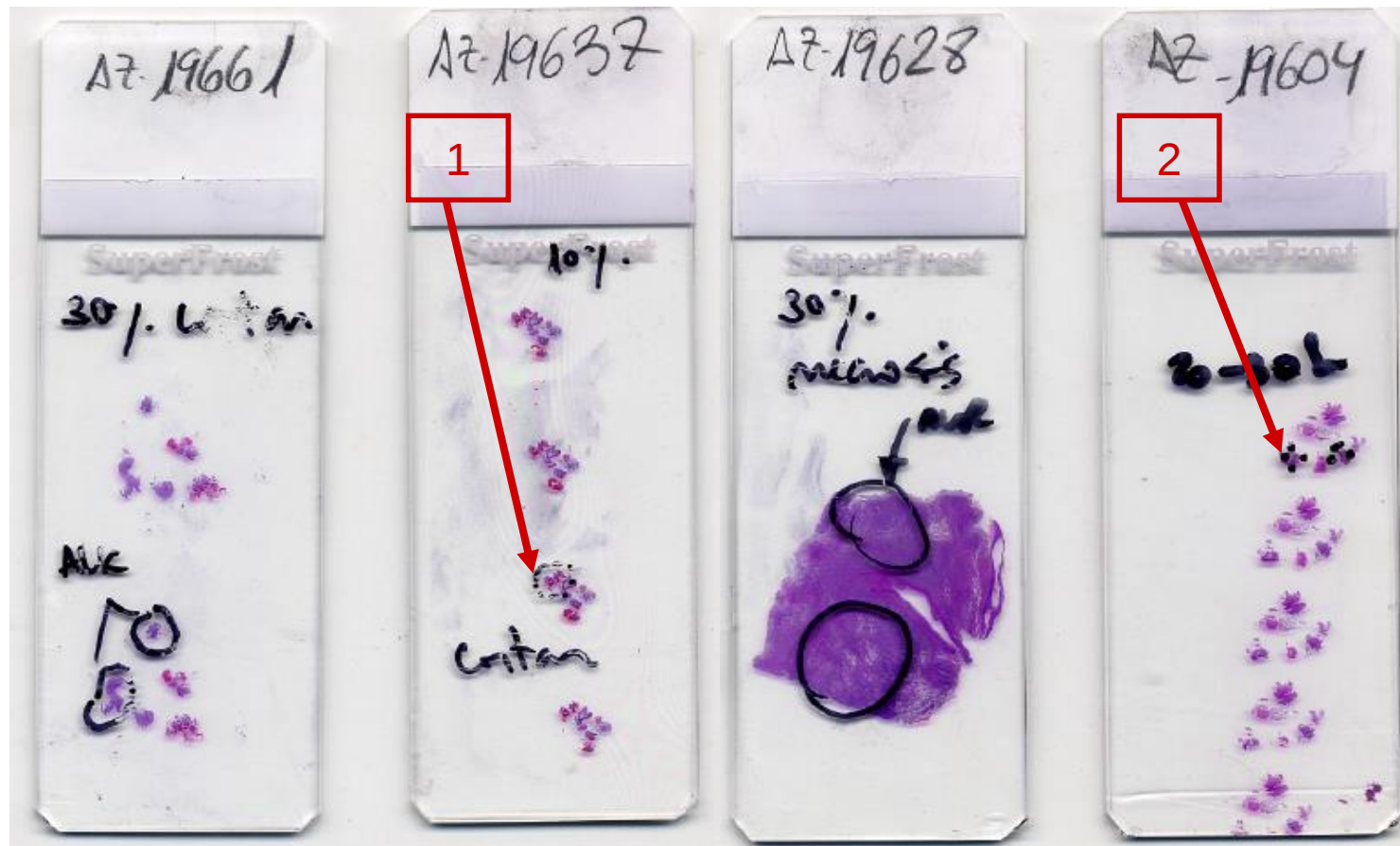
Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

0.79x

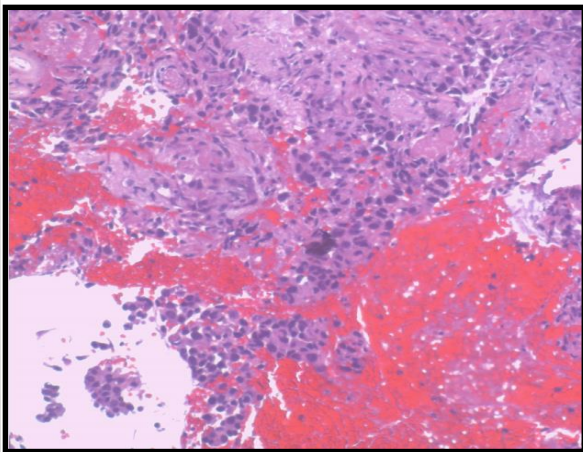
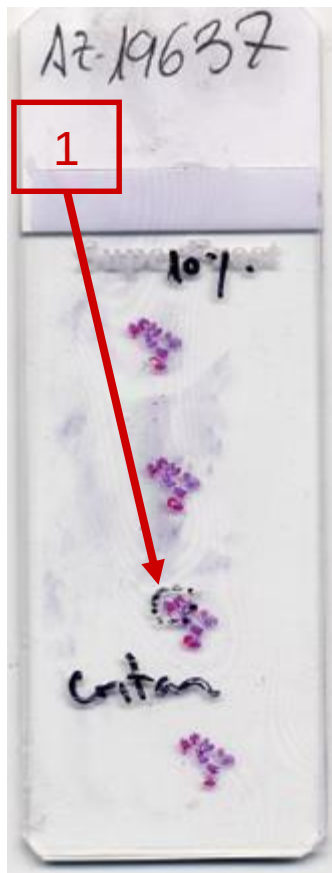




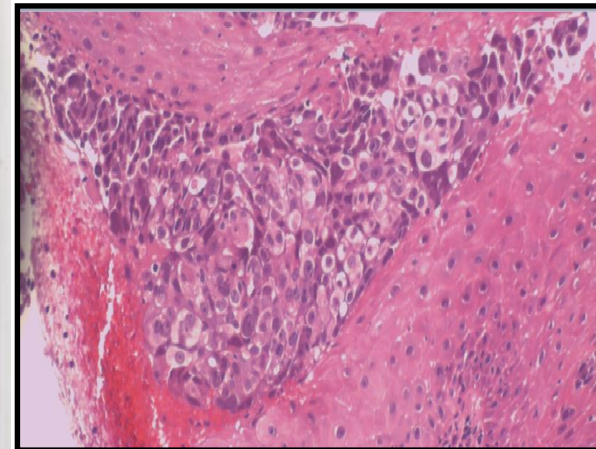
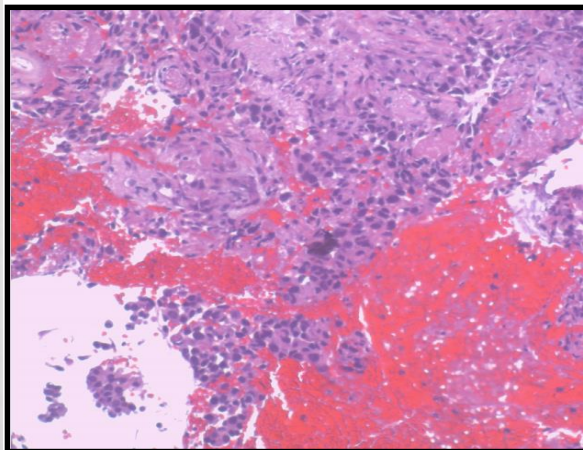
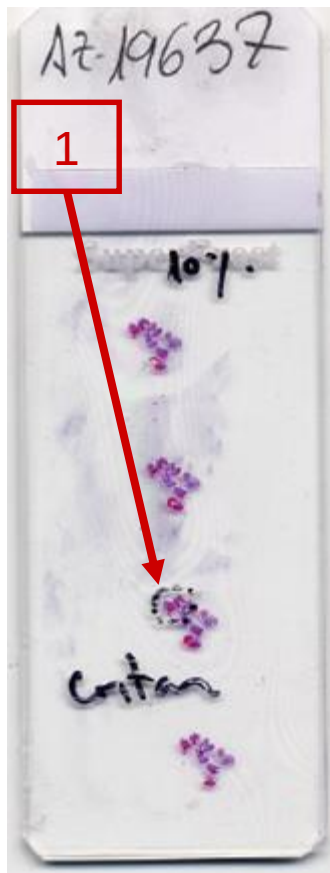
The Real World



The Real World



The Real World



Problemas detección alteraciones somáticas



Tumor

“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

La muestra podría no incluir todas las clonas.

Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

Neoplastic cell percentage estimation in tissue samples for molecular oncology: recommendations from a modified Delphi study

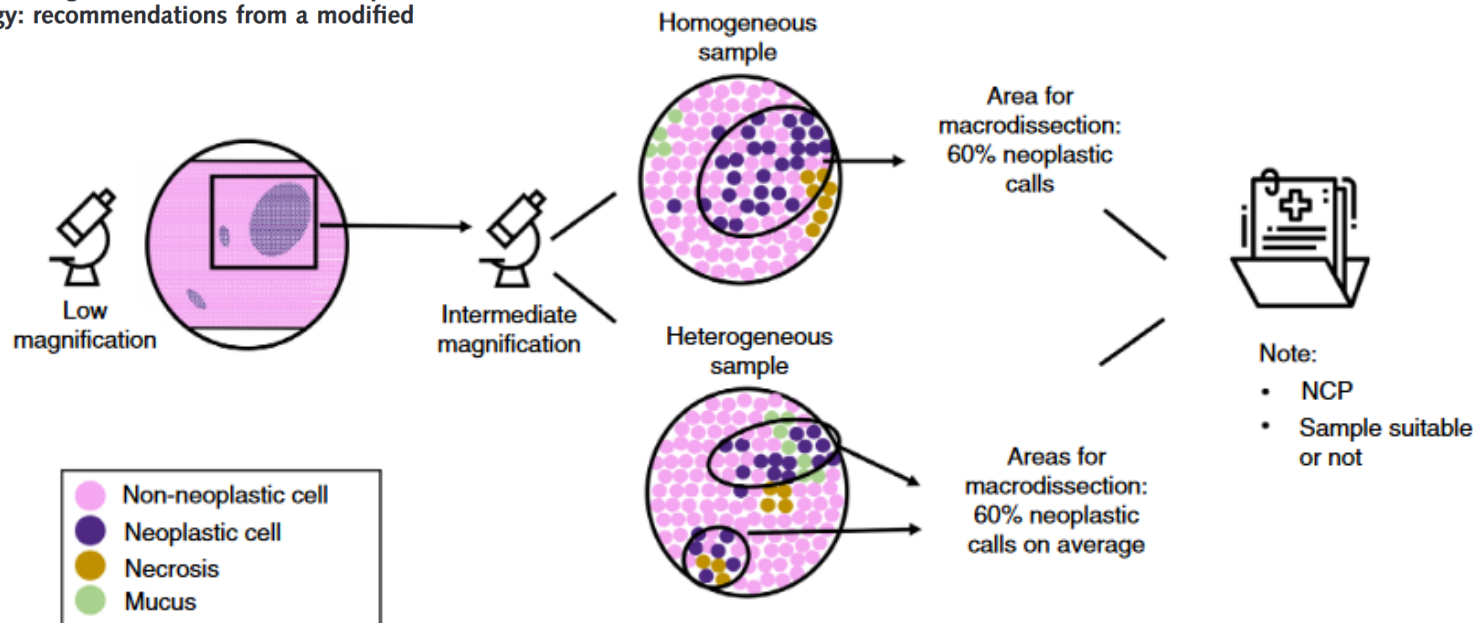
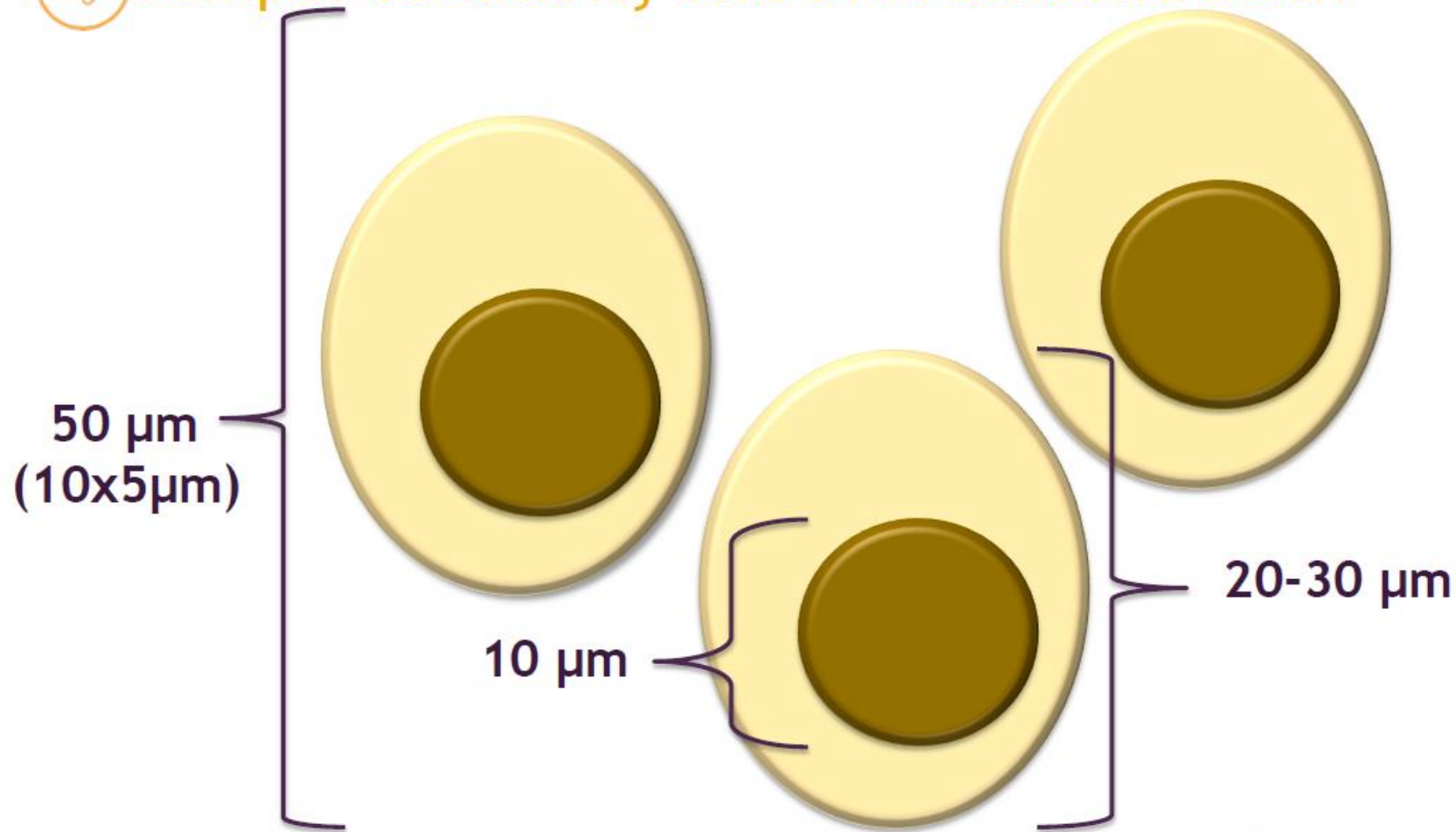
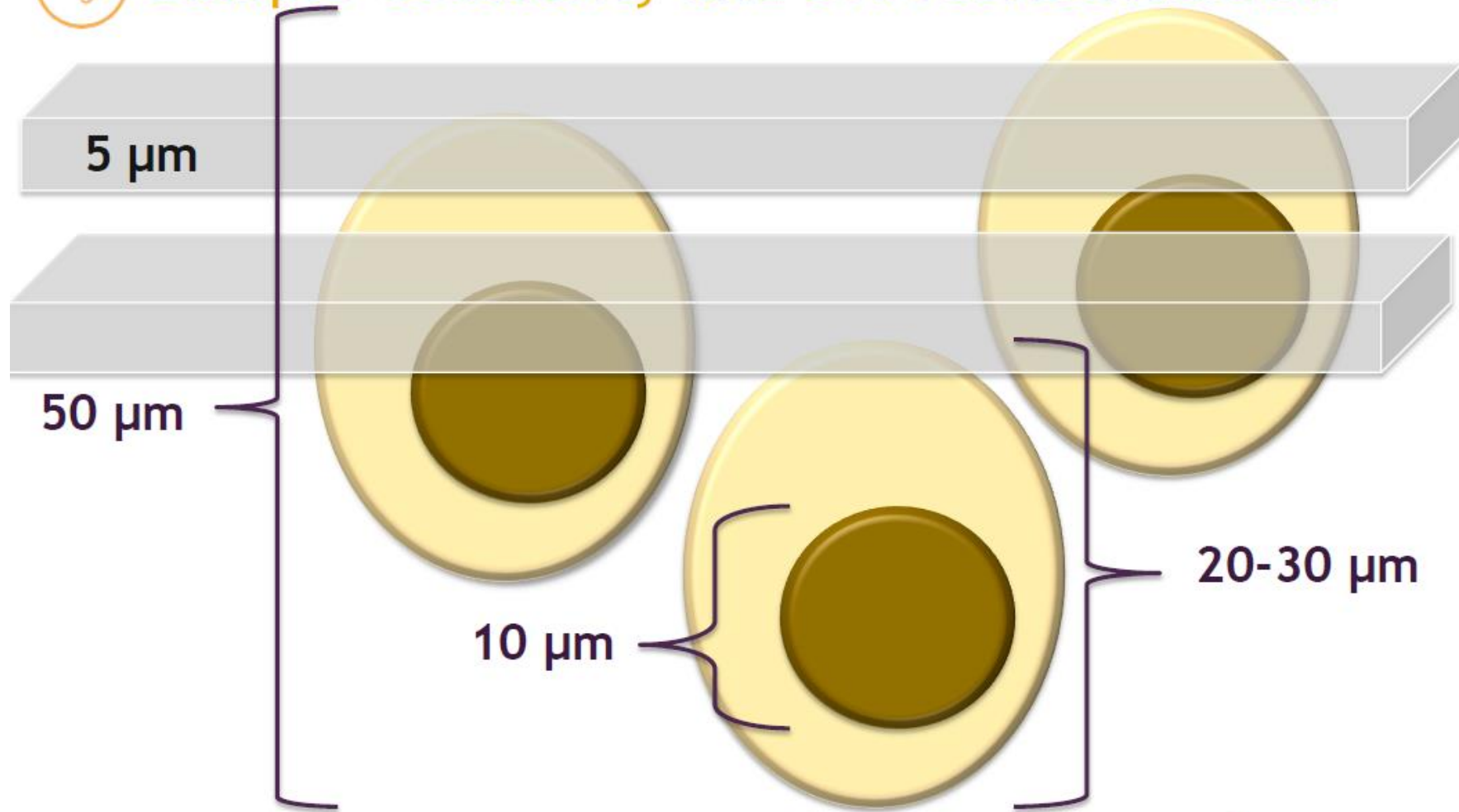


Figure 2. Proposed protocol for the determination of the neoplastic cell content. This figure visually illustrates the proposed protocol for estimating the neoplastic cell percentages (NCP). First, the most cellular area of the tumour has to be selected under low magnification and artefacts (as exemplified by Figure 1) should be avoided. At high magnification it should then be checked whether or not the area is homogeneous. For homogeneous samples the NCP could be estimated at intermediate magnification, as the percentage of neoplastic cells versus all cells in the area that will be used for macrodissection. In heterogeneous samples, the estimation is the average of estimates made under intermediate magnification in multiple areas. After determining the percentage neoplastic cells, the NCP should be noted, and also whether the sample is suitable for downstream analysis or not

➔ Sample cellularity and DNA concentration



➔ Sample cellularity and DNA concentration





Lymphocyte: $6\text{ }\mu\text{m}$

NSCLC: $36\text{ }\mu\text{m}$

Area $\approx 113\text{ }\mu\text{m}^2$

Area $\approx 5,026\text{ }\mu\text{m}^2$

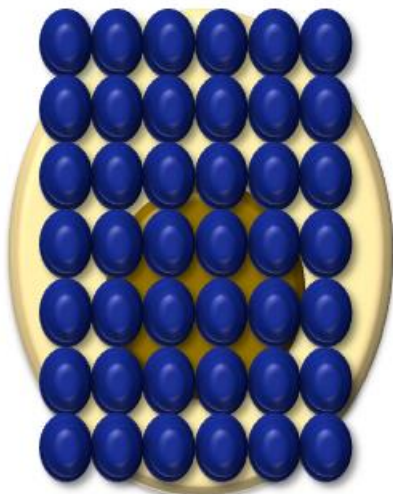
Volume $\approx 904\text{ }\mu\text{m}^3$

Volume $\approx 2.68 \times 10^5\text{ }\mu\text{m}^3$



2D $\approx$ lymphocytes/NSCLC cell

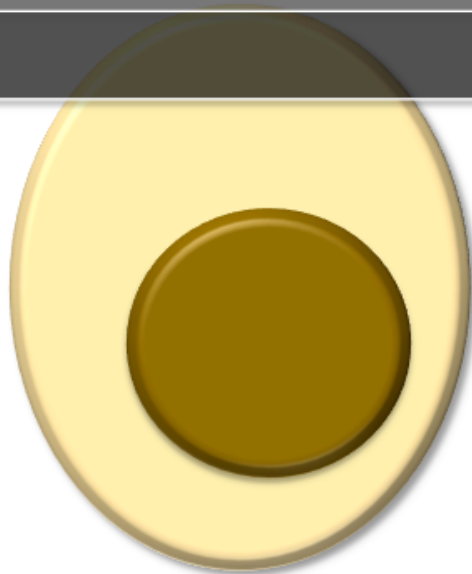
3D $\approx$ lymphocytes/NSCLC cell



⇒ Sample cellularity and DNA concentration



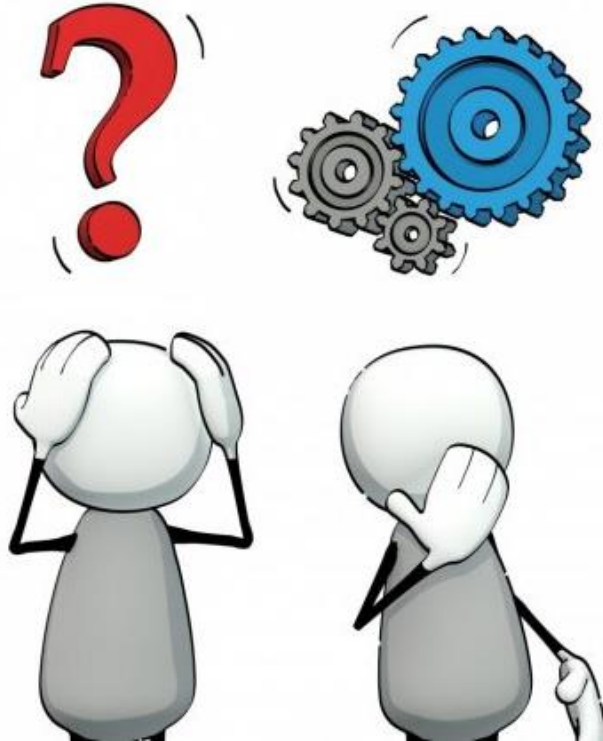
50 μm



- In 50 μm = 2,000 nuclei
- 1 nuclei (Human) = 6 pg DNA
- 2,000 nuclei = 12 ng DNA
- DNA eluted in 50 μL
- Total yield < 1 ng/μL

Sensibilidad, Especificidad, LOD

Sensibilidad, Especificidad, LOD



Sensibilidad, Especificidad, LOD

Sensibilidad (equivalente a la tasa de positivos verdaderos): Proporción de casos positivos que están bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Sensibilidad} = VP / (VP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la sensibilidad es de $10/(10+20)=0.33$. Significa que 33% de las personas positivas han sido predichas como positivas.

Especificidad (también llamada Tasa de verdaderos negativos): proporción de casos negativos que son bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Especificidad} = VN / (VN + FP)$$

En nuestro ejemplo, la especificidad es de $60/(60+10)=0.86$. Significa que 86% de las personas negativas han sido predichas como negativas.

Tasa de falsos positivos (FPR): Proporción de casos negativos que la prueba detecta como positivos. La definición matemática es :

$$FPR = FP / (TN + FP)$$

En nuestro ejemplo, el FPR es de $10/(60+10)=0.14$. Significa que 14% de las personas negativas han sido predichas como positivas.

Tasa de falsos negativos (FNR): Proporción de casos positivos que la prueba detecta como negativo.

La definición matemática es :

$$FNR = FN / (TP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la prevalencia es de $(20+10)/100=0.3$. Significa que en verdad hay 30% de casos positivos en el grupo.

Sensibilidad, Especificidad, LOD

Sensibilidad (equivalente a la tasa de positivos verdaderos): Proporción de casos positivos que están bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Sensibilidad} = VP / (VP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la sensibilidad es de $10/(10+20)=0.33$. Significa que 33% de las personas positivas han sido predichas como positivas.

Especificidad (también llamada Tasa de verdaderos negativos): proporción de casos negativos que son bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Especificidad} = VN / (VN + FP)$$

En nuestro ejemplo, la especificidad es de $60/(60+10)=0.86$. Significa que 86% de las personas negativas han sido predichas como negativas.

Tasa de falsos positivos (FPR): Proporción de casos negativos que la prueba detecta como positivos. La definición matemática es :

$$\text{FPR} = FP / (TN + FP)$$

En nuestro ejemplo, el FPR es de $10/(60+10)=0.14$. Significa que 14% de las personas negativas han sido predichas como positivas.

Tasa de falsos negativos (FNR): Proporción de casos positivos que la prueba detecta como negativo.

La definición matemática es :

$$\text{FNR} = FN / (TP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la prevalencia es de $(20+10)/100=0.3$. Significa que en verdad hay 30% de casos positivos en el grupo.

Sensibilidad, Especificidad, LOD

Sensibilidad (equivalente a la tasa de positivos verdaderos): Proporción de casos positivos que están bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Sensibilidad} = VP / (VP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la sensibilidad es de $10/(10+20)=0.33$. Significa que 33% de las personas positivas han sido predichas como positivas.

Especificidad (también llamada Tasa de verdaderos negativos): proporción de casos negativos que son bien detectados por la prueba. La definición matemática es:

$$\text{Especificidad} = VN / (VN + FP)$$

En nuestro ejemplo, la especificidad es de $60/(60+10)=0.86$. Significa que 86% de las personas negativas han sido predichas como negativas.

Tasa de falsos positivos (FPR): Proporción de casos negativos que la prueba detecta como positivos. La definición matemática es :

$$FPR = FP / (TN + FP)$$

En nuestro ejemplo, el FPR es de $10/(60+10)=0.14$. Significa que 14% de las personas negativas han sido predichas como positivas.

Tasa de falsos negativos (FNR): Proporción de casos positivos que la prueba detecta como negativo.

La definición matemática es :

$$FNR = FN / (TP + FN)$$

En nuestro ejemplo, la prevalencia es de $(20+10)/100=0.3$. Significa que en verdad hay 30% de casos positivos en el grupo.

Sensibilidad, Especificidad, LOD

El **límite de detección** (LOD, limit of detection), expresado como la cantidad o concentración, proviene de la señal más pequeña que puede detectarse con razonable certeza en un determinado procedimiento analítico (IUPAC). Según esto, se trata de la cantidad asociada a la mínima señal que pueda atribuirse al analito, es decir, que sea distinguible de la señal del blanco de medida. Esa señal mínima se suele definir como la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco:

$$Y_{LOD} = \bar{Y}_B + 3s_B$$

Y_{LOD} es la señal correspondiente al límite de detección, $\bar{Y}_B$ la señal promedio del blanco y s_B la desviación estándar de la señal del blanco

Sensibilidad, Especificidad, LOD

Tabla 6 Selección y realización de la técnica molecular más adecuada

Técnicas disponibles	Sensibilidad (%DNA mutado)	Características
<i>Secuenciación directa</i>		
Método de Sanger	25	• Requiere mayor cantidad de DNA mutado para su detección. • Detecta cualquier mutación.
Pirosecuenciación	5-10	• Barato. • Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador).
<i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>		
TaqMan PCR	10	• No hay kit comercial.
Scorpions ARMS	1	• Requiere termociclador de tiempo real. • Solo detecta mutaciones específicas. • Kit comercial disponible con las sondas. • Requiere termociclador de tiempo real. • Solo detecta mutaciones específicas.
<i>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</i>		
PNA-LNA PCR clamp	1-0.1	• Se precisan sondas LNA para hacer clamp que no son comerciales.
COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature)	1-0.1	• Requiere amplia experiencia en biología molecular.
<i>PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)</i>	5	• Solo detecta mutaciones específicas • Requiere amplia experiencia en biología molecular. • Se puede asociar con técnicas de secuenciación y pirosecuenciación.
<i>dHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)</i>		• Solo detecta mutaciones que generan lugar de restricción.
		• Requiere equipamiento especial. • Precisa experiencia en HPLC. • Detecta cualquier mutación. • Detecta cualquier mutación.
<i>HRM (High Resolution Melting)</i>	1	
	1	• Precisa equipamiento específico. • Requiere experiencia en biología molecular.

Sensibilidad, Especificidad, LOD

Tabla 3 Principales métodos empleados para la determinación de mutaciones de *EGFR*

Técnica	Sensibilidad (% ADN mutado)	Mutaciones identificadas	Detección precisa de deleciones e inserciones
<i>Secuenciación directa</i>			
Método de Sanger	25	Conocidas y nuevas	Sí
Pirosecuenciación	5-10	Conocidas y nuevas	Sí
<i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>			
TaqMan PCR	10	Solo conocidas	No
Scorpions ARMS	1	Solo conocidas	No
<i>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</i>			
PNA-LNA PCR clamp	1	Solo conocidas	No
Digestión con enzimas de restricción	0,2	Solo conocidas	No
Smart	0,1	Solo conocidas	No
COLD-PCR	1-10	Conocidas y nuevas	Sí
<i>PCR-RFLP</i>	5	Solo conocidas	Sí
<i>dHPLC</i>	1	Conocidas y nuevas	Sí
<i>Inmunohistoquímica</i>	Desconocida	Solo conocidas	Sí

Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica

José Javier Gómez^{1,2}, Javier de Castro³, Ángel Concha⁴, Enriqueta Felip⁵, Dolores Isla⁶, Fernando López-Rios⁷, Luis Paz-Ares⁸, José Ramírez⁹, Julián Sanz¹ y Pilar Garrido¹

acción refractaria a la amplificación; COLD: coamplificación a temperaturas de desnaturalización más bajas; dHPLC: natografía líquida de alto rendimiento; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; PCR: reacción en sa; PNA-LNA: ácido nucleico peptídico-ácido nucleico bloqueado; RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos

Sensibilidad, Especificidad, LOD

TABLE 1 | Sensitivity and specificity of the most commonly *BRAF* diagnostic techniques.

The Current State of Molecular Testing in the BRAF-Mutated Melanoma Landscape

José Vilar^{1,2}, Erica Teresa Tenda³, Francesco Spagnolo⁴, Virginia Andreatti^{1,4}, William Bruno^{1,2} and Paolo Ghossein^{1,2}

Diagnostic technique	Sensitivity%	Specificity%	LOD%
IHC	93–97	92–98	-
Sanger sequencing	80–93	100	20–25
Pyrosequencing	95–100	90–100	5–10
Real-time PCR based techniques	93–99.5	98–100	0.5–5
dPCR	100	95	0.001
HRM	87–99	96–99	5.0
MALDI-TOF MS	97.6	100	1–5
NGS	98	100	5

LOD

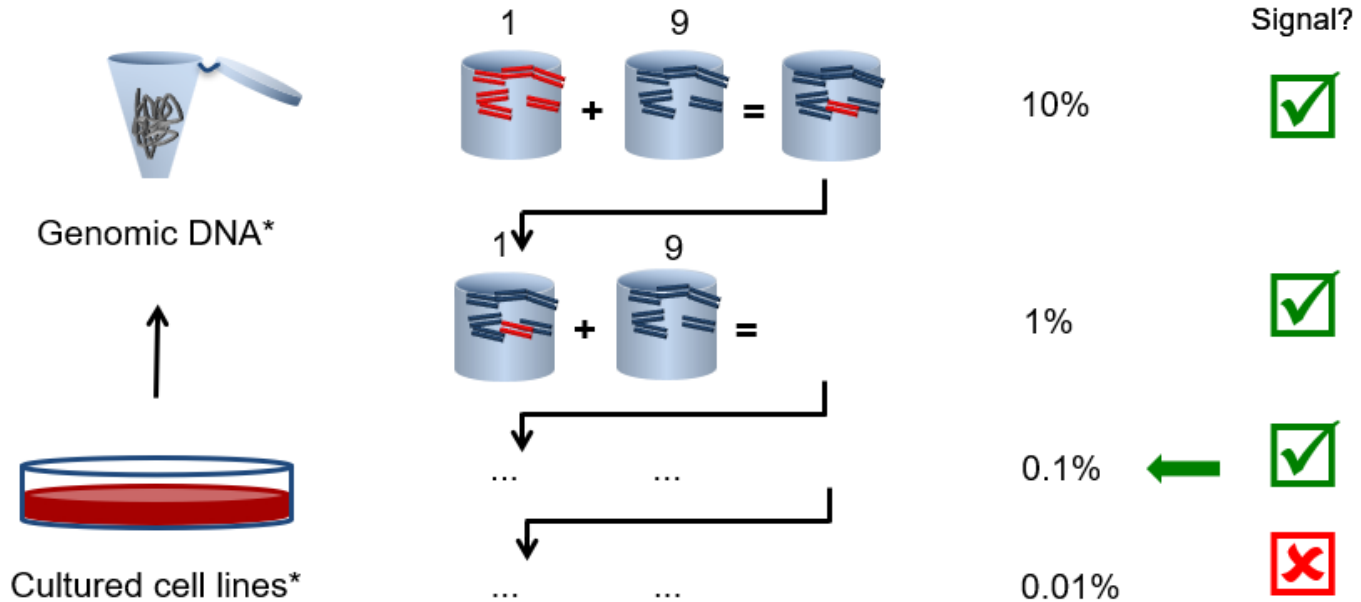
Reference DNA with
known *gene X* mutation



Serial dilution of mutant
DNA into wild-type DNA*



Run test and
determine LOD*



LOD

Sustitución de ácidos nucleicos	Sustitución de aminoácidos	LOD (unid. %)	ID COSMIC* (V47)
Codón 12 (GGT)			
AGT	G12S	3,4	563
TGT	G12C	2,5	562
CGT	G12R	2,4	561
GAT	G12D	3,8	564
GTT	G12V	8,8	566
GCT	G12A	2,5	565

LOD



Tumor

“ADN Gen X Nativo”:

- Células tumorales con ADN no mutado
- Células normales acompañantes p.e.:
 - Linfocitos
 - Macrófagos
 - Células endoteliales
 - Fibroblastos

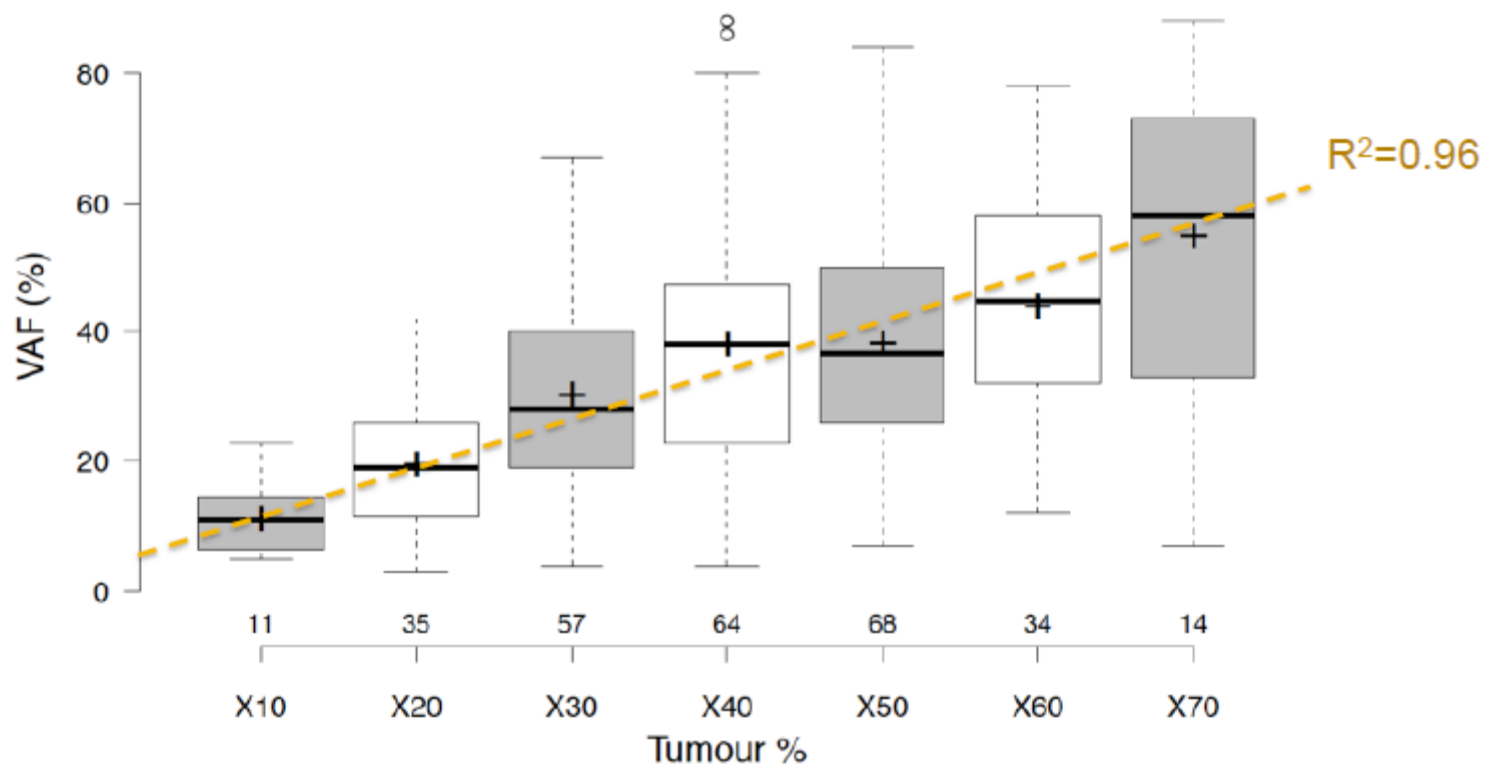
Alta variabilidad inter observador en la estimación del porcentaje tumoral

La muestra podría no incluir todas las clonas.



Cantidad
de células
clonales

Tumour % vs VAF (CRC)



Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors

Isabelle Sourrouille · Florence Coulet · Jeremie H. Lefevre · Chrystelle Colas ·
Mélanie Eyries · Magali Svrcek · Armelle Bardier-Dupas · Yann Parc ·
Florent Soubrier

Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI

Table 1 Characteristics of the patients

Patient	Gender	Age at diagnosis	MSI	Loss in IHC staining	Bethesda	Amsterdam	Number of detected somatic mutations
1	F	59	+	MLH1	+	–	1
2	F	64	+	MLH1	–	–	–
3	M	49	+	MLH1	–	–	1
4	M	62	+	MLH1	–	–	–
5	F	57	+	MLH1	–	–	1
6	F	24	+	MLH1	–	–	–
7	F	53	+	MLH1	–	–	2
8	F	24	+	MSH2	+	–	1
9	F	51	+	MSH2	–	–	2
10	F	79	+	MSH2	+	–	2
11	M	57	+	MSH2	–	–	1
12	M	62	+	MSH2	+	+	2
13	M	61	+	MSH2	–	–	–
14	M	61	+	MSH2	–	–	2
15	M	61	+	MSH2	–	–	–
16	F	70	+	MSH2	+	–	1
17	M	46	+	MSH2	+	–	1
18	F	38	+	–	+	–	–

Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors

Isabelle Sourrouille · Florence Coulet · Jeremie H. Lefevre · Chrystelle Colas ·
Mélanie Eyries · Magali Svrcek · Armelle Bardier-Dupas · Yann Parc ·
Florent Soubrier

	Somatic hit no 1	Somatic hit no 2	Diagnosis
Patient no 8	c.942 + 3A>T	–	–
Patient no 9	c.664delA (p.Ile222PheX2)	c.1147C>T (p.Arg383X)	Double somatic mutation
Patient no 10	c.2541delA (p.Lys847fsX44)	Deletion <i>MSH2</i> and <i>EpCAM</i>	Somatic mosaicism
Patient no 11	c.1165C>T (p.Arg389X)	–	–
Patient no 12	c.2038C>T (p.Arg680X)	c.942 + 3A>T	Lynch syndrome
Patient no 14	c.645 + 1G>A (alternate splicing)	c.1069G>T (p.Glu357X).	Double somatic mutation
Patient no 16	c.1823–1827delGCTTT	–	–
Patient no 17	Deletion of <i>MSH2</i> and <i>MSH6</i>	–	–

Muestra

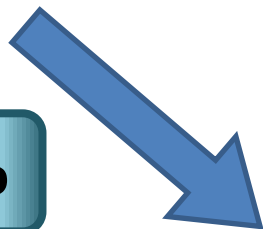
Germinal/Somático

Alteración

Nº alteraciones

Herramienta

Tiempo de respuesta



Alteración

Nº alteraciones



Herramienta

Alteraciones gen *MET*

Amplificación

Reordenamientos

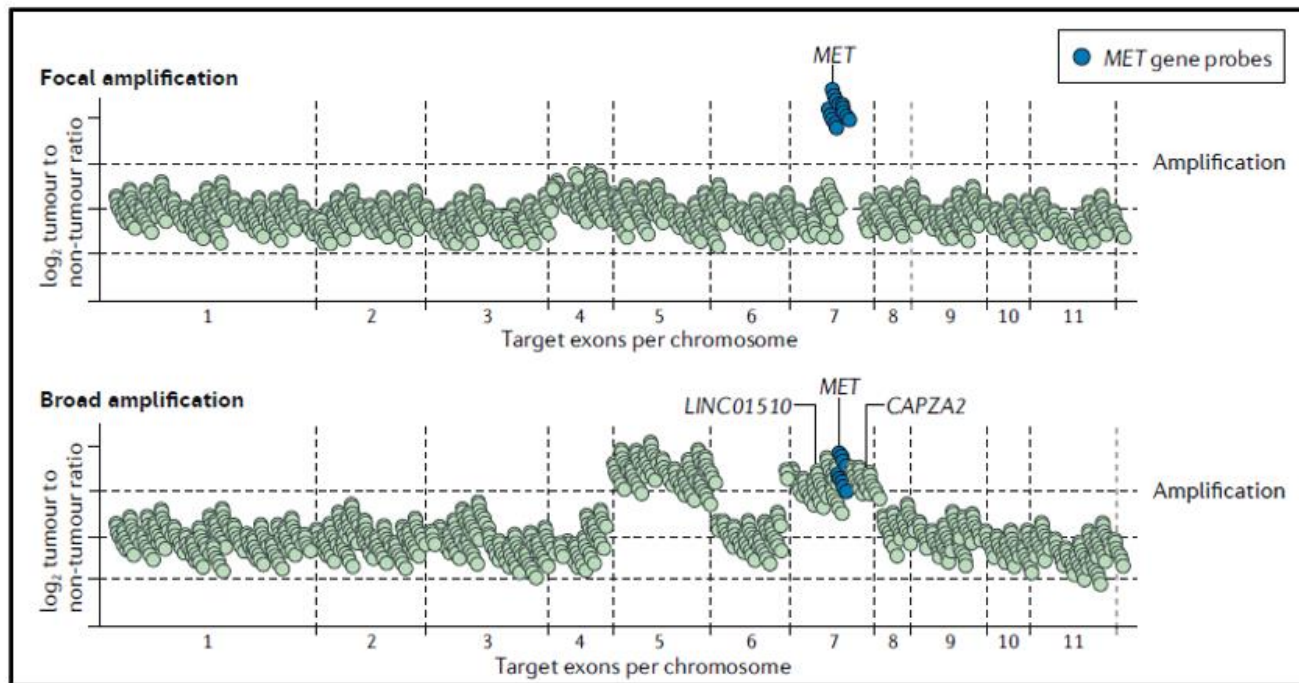
Mutaciones

Alteraciones gen *MET*

Amplificación

Reordenamientos

Mutaciones



Alteraciones gen *MET*

Amplificación

Reordenamientos

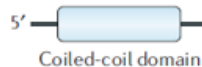
Mutaciones

5' upstream gene partner

MET fusion

MET gene

Known dimerization mechanism



- CLIP2
- BAIAP2L1
- TRIM4
- EPS15
- TFG
- C8orf34
- PPFIBP1
- DCTN1
- KIF5B
- TPR
- LRRFIP1

Alternative dimerization mechanism

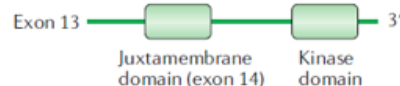
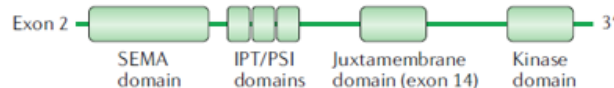


- STARD3NL
- ZKSCAN1

Unknown mechanism



• OXR1	• MYH15	• SLC1A2
• CAV1	• ZKSCAN1	• CDH1
• GPRC5C	• WNT2	• CNTNAP5
• PRKAR2A	• HLA-DRB1	• PPP1R9A
• DYNC1I1	• CAPZA2	• SRPK2
• ZNF277	• FOXN2	• CADPS2
• PTPRZ1	• GTF2I	• PCM1
• ST7	• KMT2E	• CD47
• TNFRSF18	• ANKRD7	

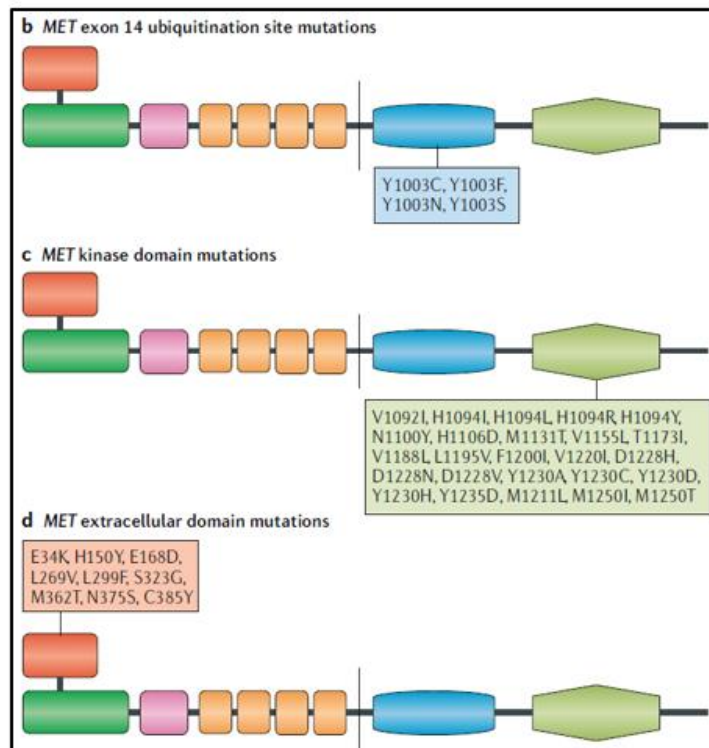


Alteraciones gen *MET*

Amplificación

Reordenamientos

Mutaciones

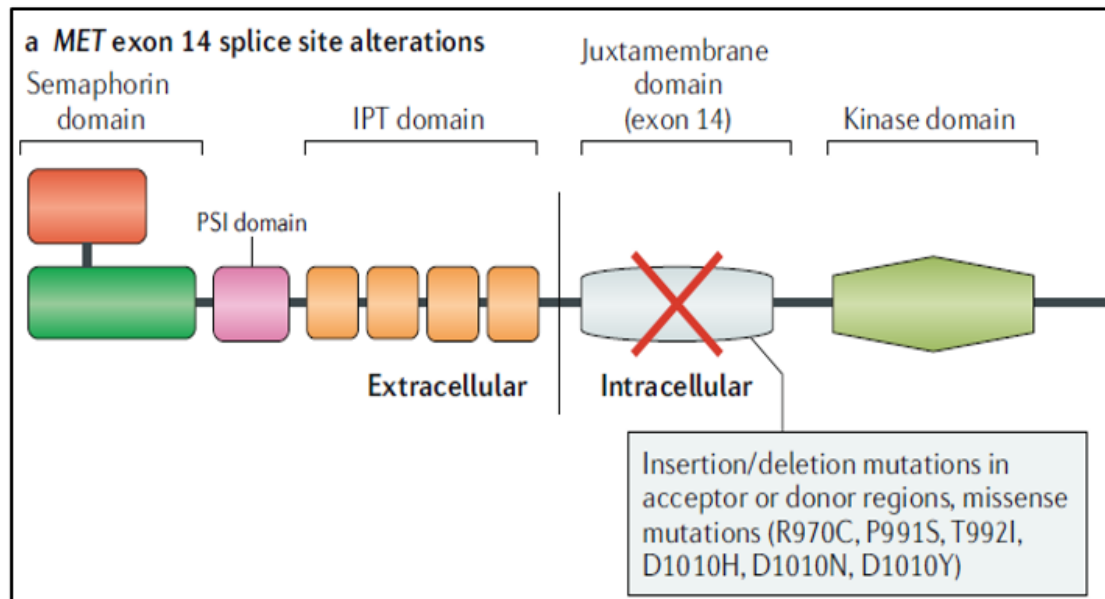


Alteraciones gen *MET*

Amplificación

Reordenamientos

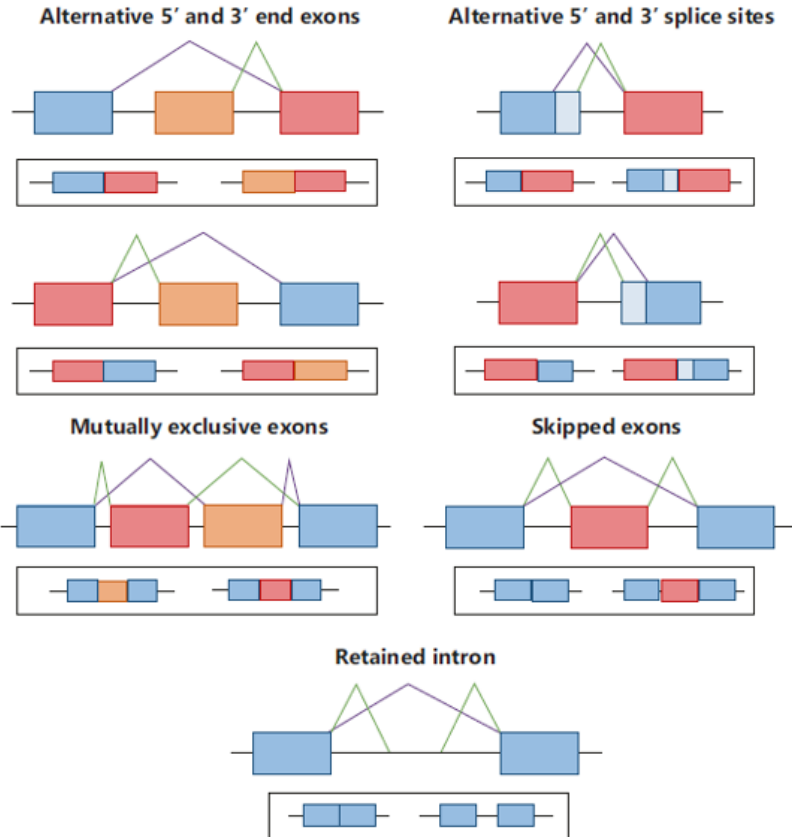
Mutaciones



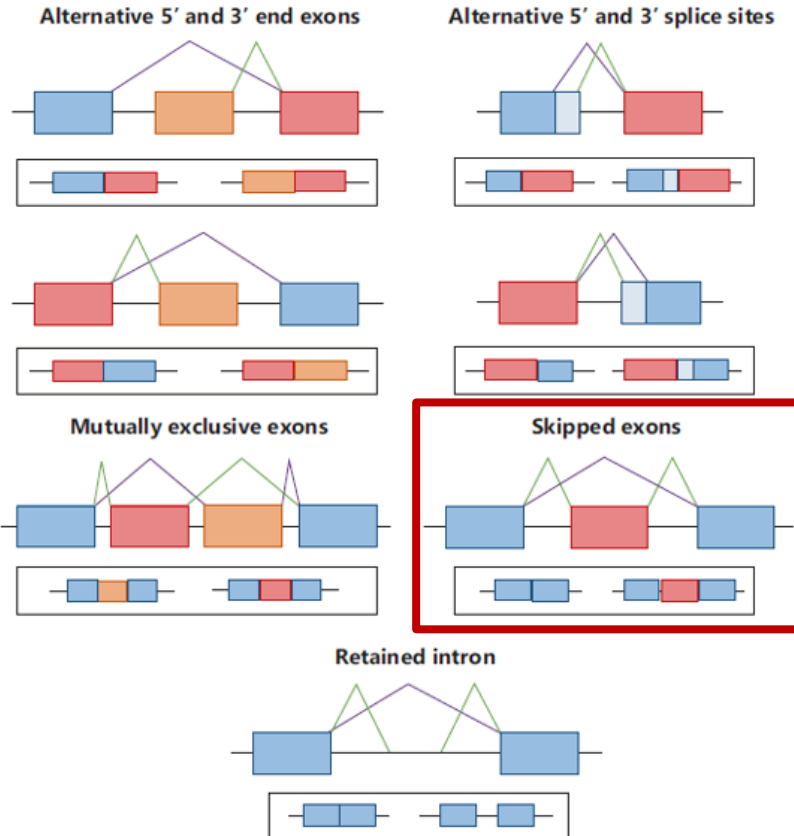
Alteraciones gen *MET*

¿Que metodología escogemos para evaluar la presencia o ausencia del *exon-skipping* del gen *MET*?

Exon-skipping

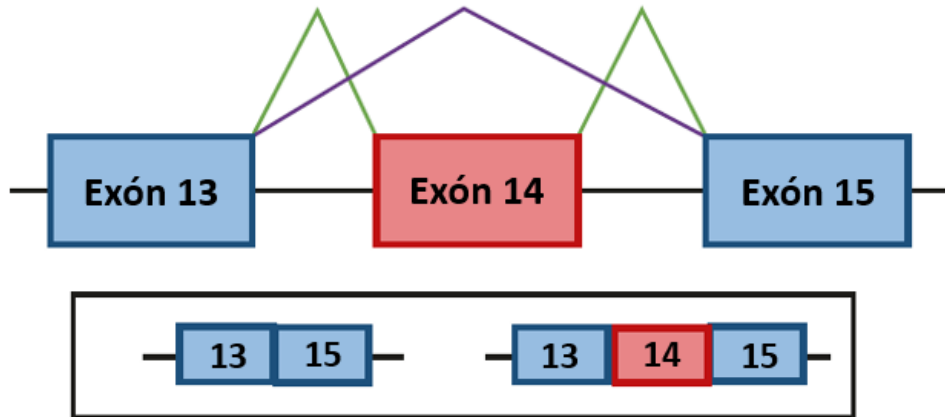


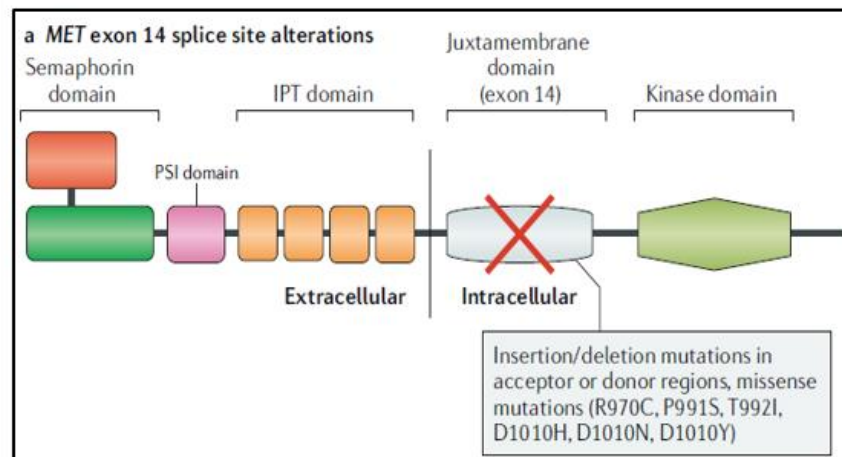
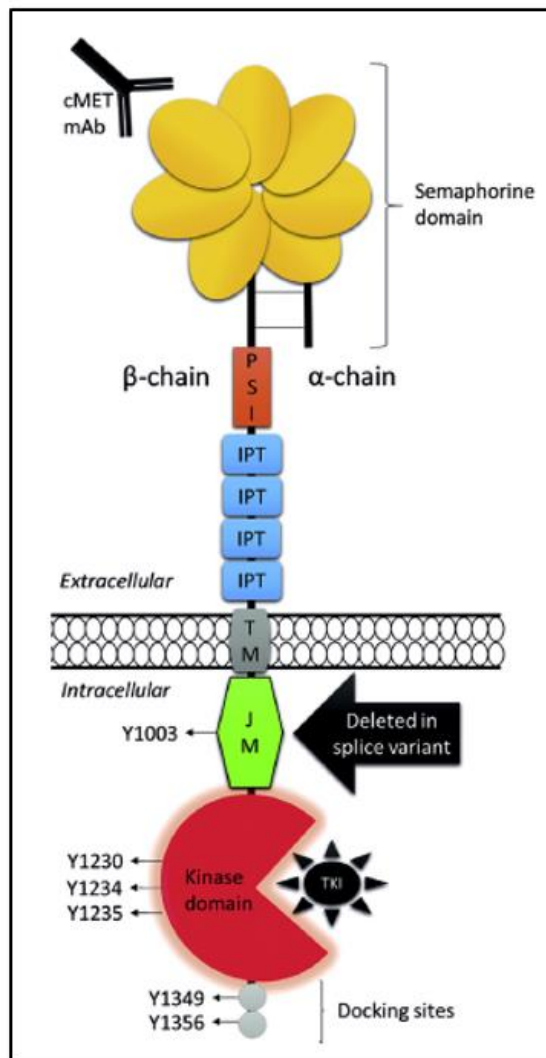
Exon-skipping



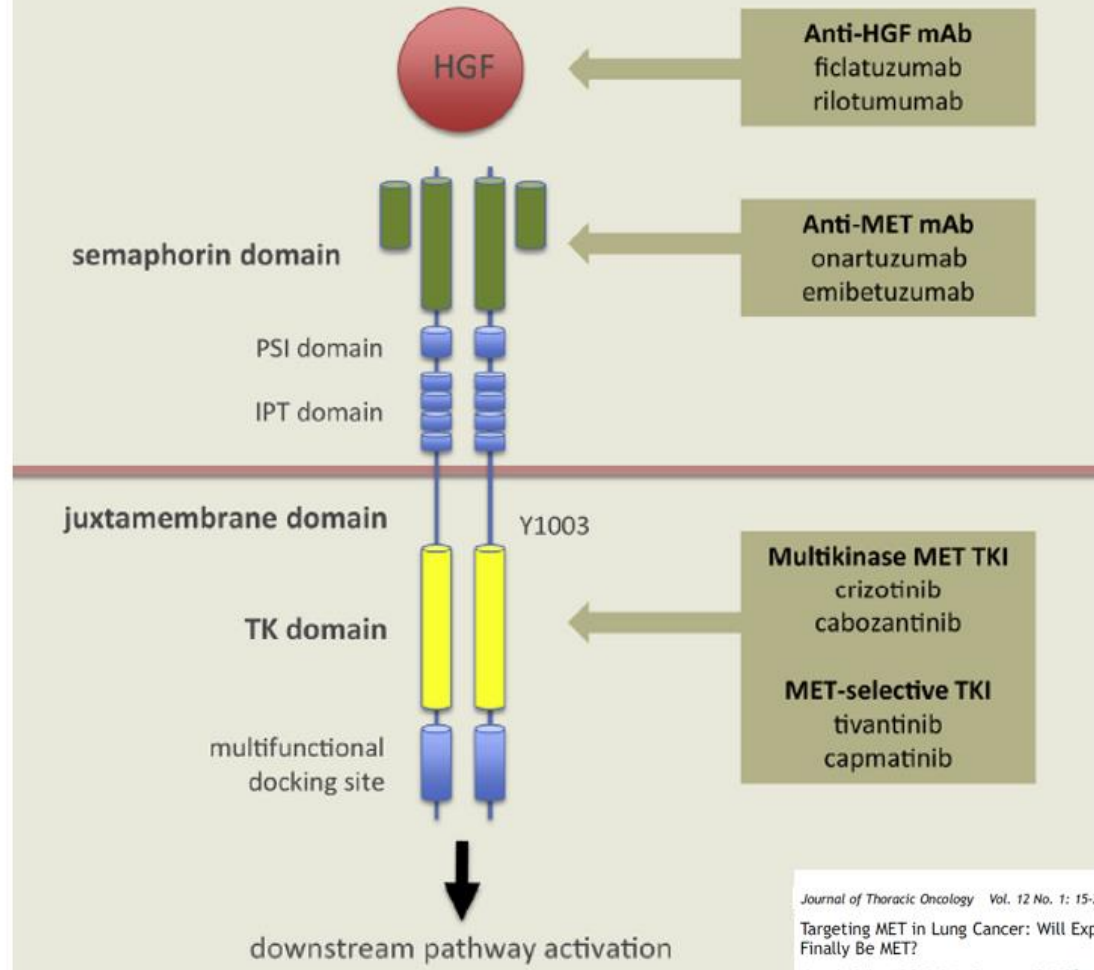
Exon-skipping

Skipped exons





selected targeted therapies



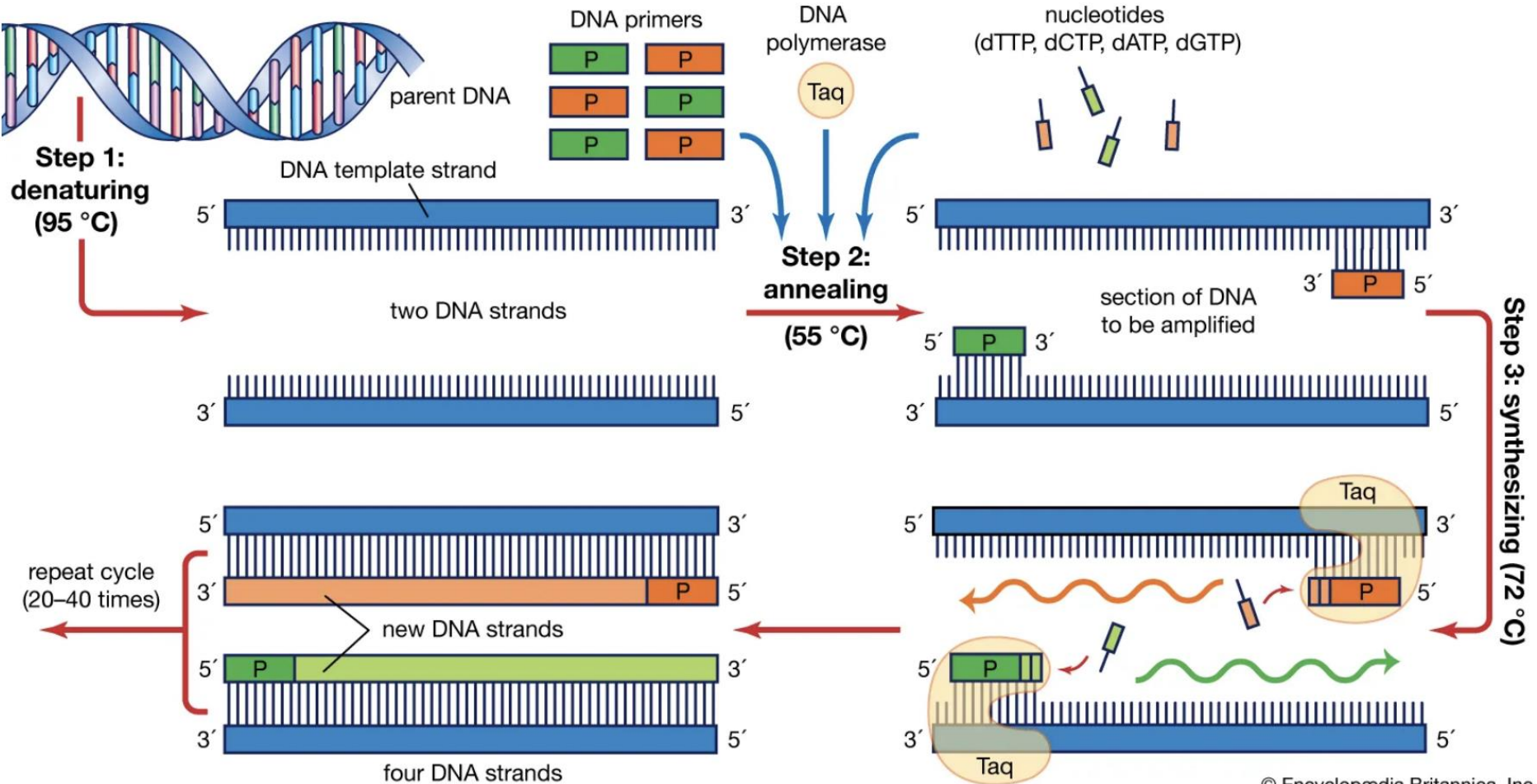
Alteraciones gen *MET*

¿Que metodología escogemos para evaluar la presencia o ausencia del *exon-skipping* del gen *MET*?

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • Iª, IIª, IIIª generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • Secuenciación • Cariotipo	• FISH, CISH, SISH • Definir regiones • Resolución • DNA • Interpretación
SV	• ISH • Secuenciación • Cariotipo	• FISH • DNA y RNA • Interpretación

Alteración	Herramienta	Observaciones
SNV/InDel	• PCR convencional • Secuenciación • PCR en tiempo real • HRM	• PCR + RFLP • Iª, IIª, IIIª generación • Sondas diferentes • Cribado
CNV	• ISH • MLPA • aCGH • Secuenciación • Cariotipo	• FISH, CISH, SISH • Definir regiones • Resolución • DNA • Interpretación
SV	• ISH • Secuenciación • Cariotipo	• FISH • DNA y RNA • Interpretación

PCR



[illegible]

[illegible]

CGTAGG
TAT **AA** GC
GAGAT

Región 1

CGTAGG
ATAGCG
CGAGAC
CGAGC

Región 2

GTG

Región 3

CGTAGG
TAT **AA** GC
CGAGAT

AGCGCT
AGACCT

CGTAGG
TATAGCG
CGAGAC

GTGAC

GTGAC

Región 3

Electroforesis

- La electroforesis se define como el movimiento diferencial por atracción o repulsión en un campo eléctrico de iones o moléculas cargados
- Estos iones o moléculas se separan por las fuerzas del campo eléctrico aplicado y se moverán en una matriz sólida (gel de agarosa o de poliacrilamida, otros polímeros)
- Habrá dos polos cargados, uno positivo y uno negativo
- El movimiento de las moléculas se llama migración
- El ADN tiene carga negativa

Power supply



sample wells

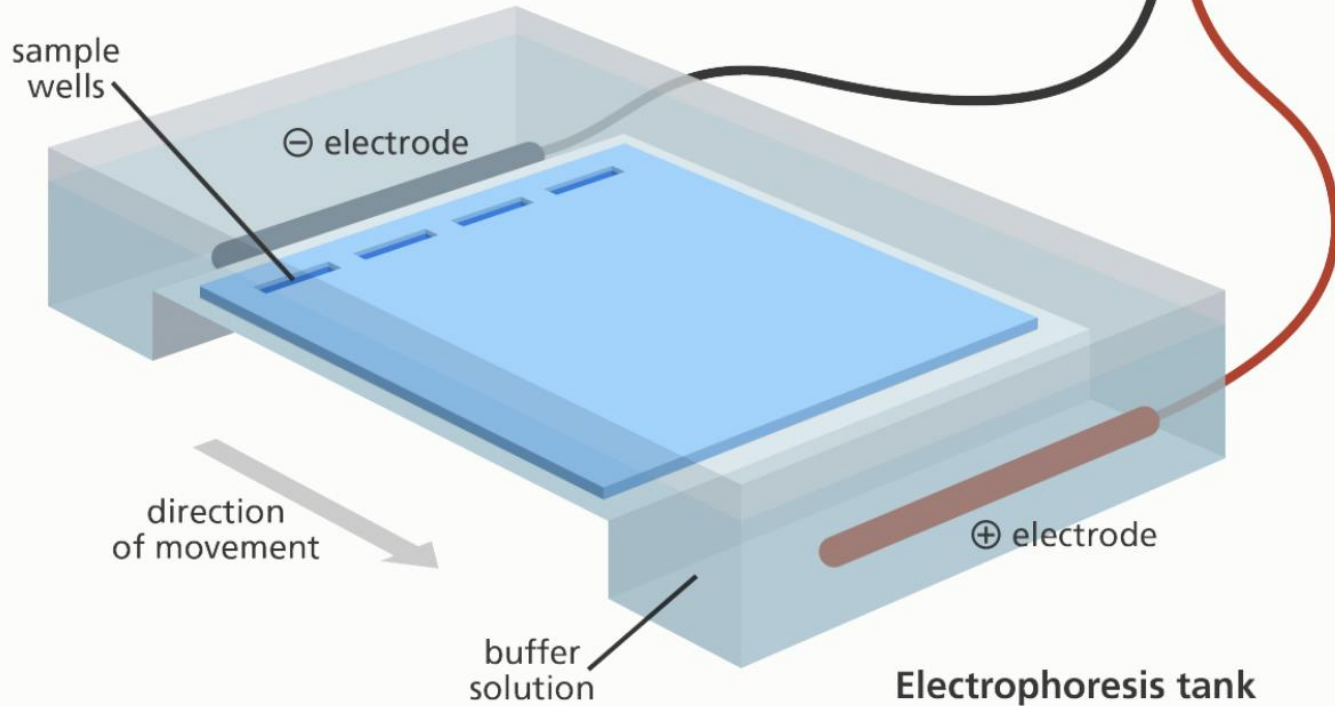
$\ominus$ electrode

direction
of movement

buffer
solution

$\oplus$ electrode

Electrophoresis tank



Tipos de PCR

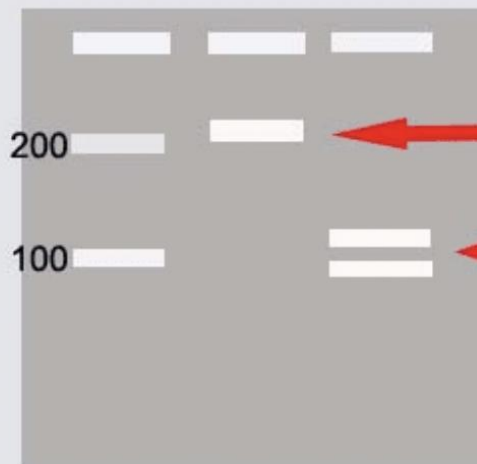
- Basic PCR
- Reverse Transcription PCR (RT-PCR)
- Real Time PCR
- Nested PCR
- Multiplex PCR
- Methylation Specific PCR
- Otras

PCR + RFLP

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción



Secuencia de Restricción



La enzima no corta el fragmento amplificado y mantiene el tamaño original.

La enzima corta el fragmento amplificado en dos fragmentos

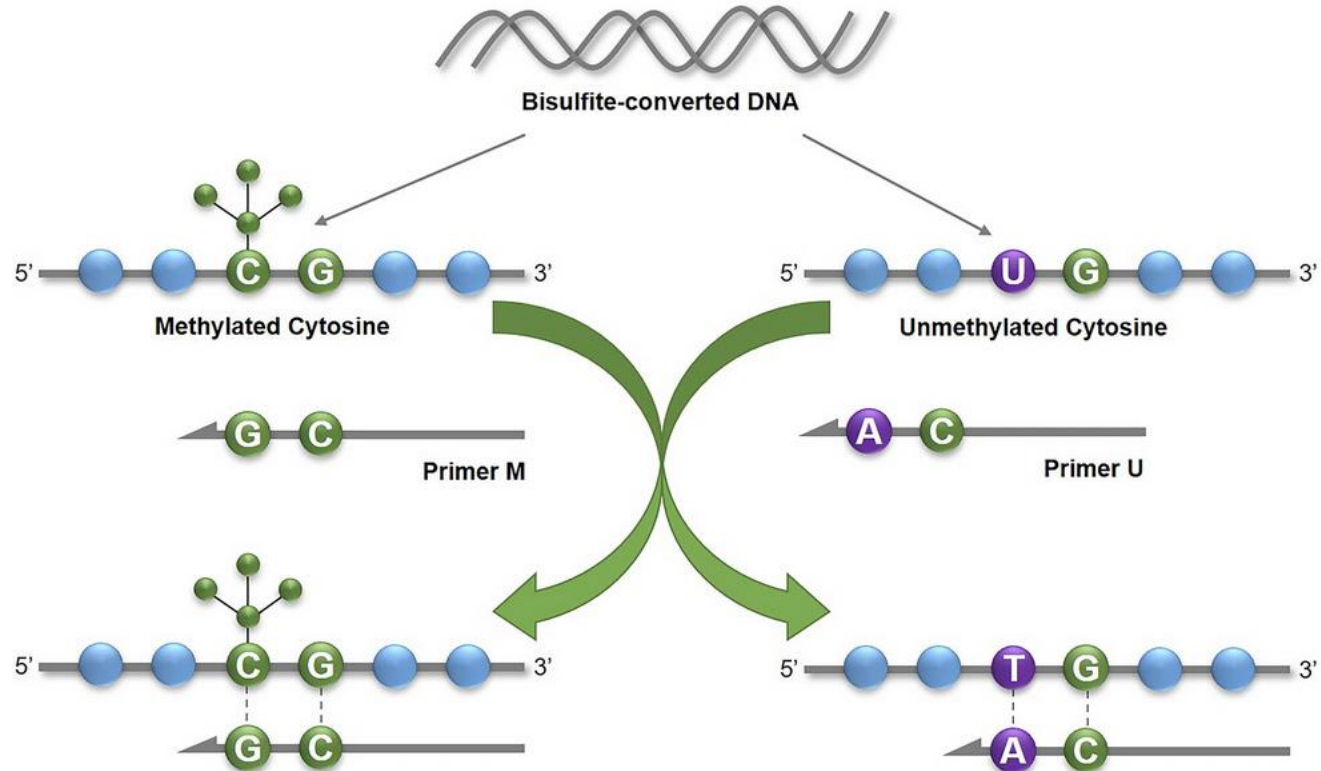
MS-PCR

Sample
Preparation

Bisulfite
Treatment

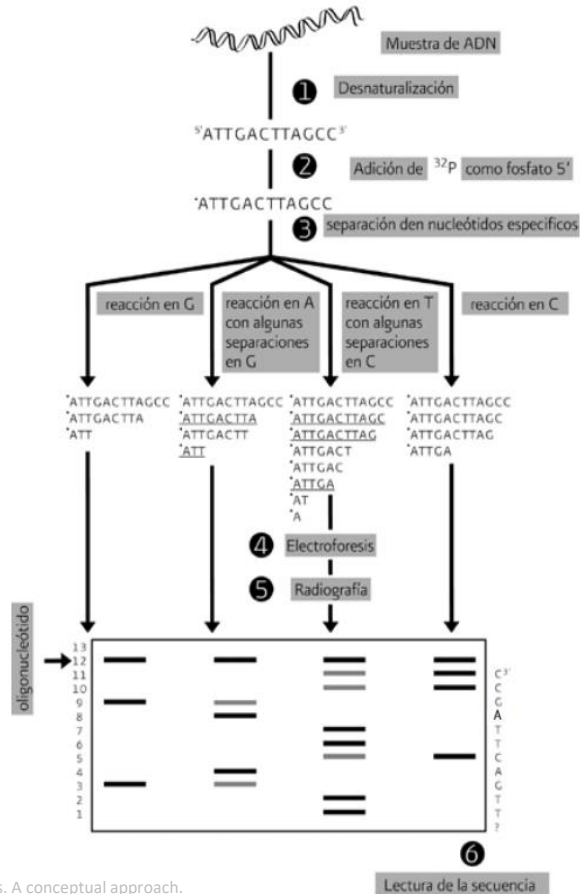
Methylation-
Specific PCR

PCR Data
Analysis

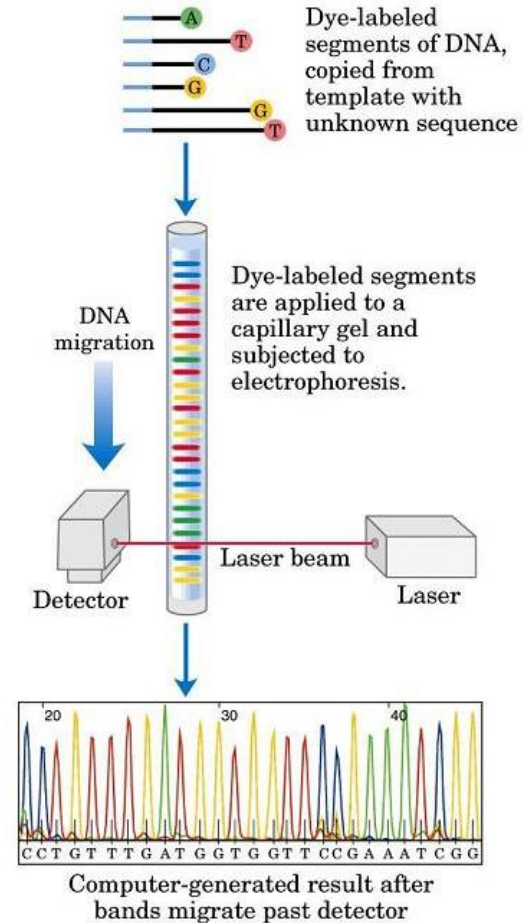


Secuenciación

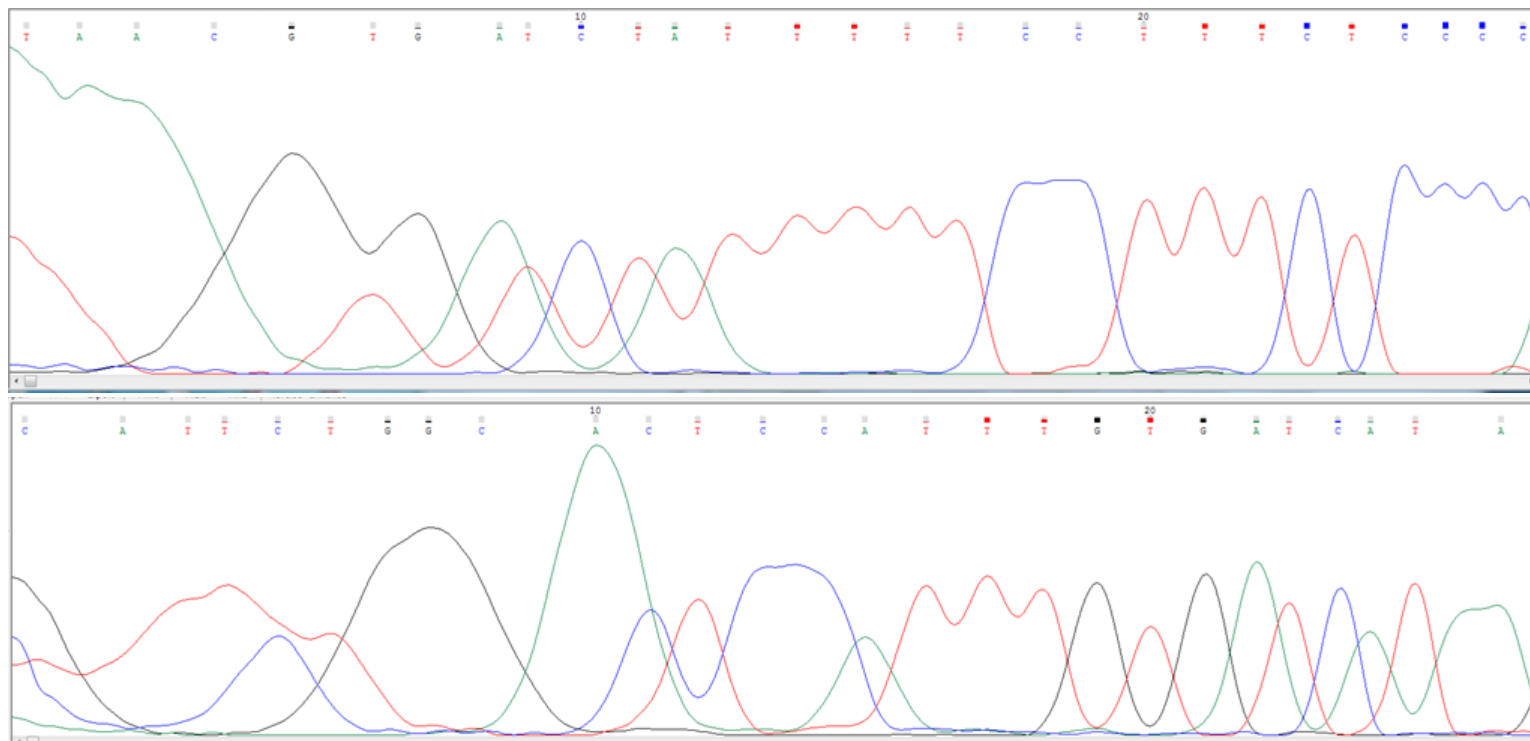
Maxam-Gilbert



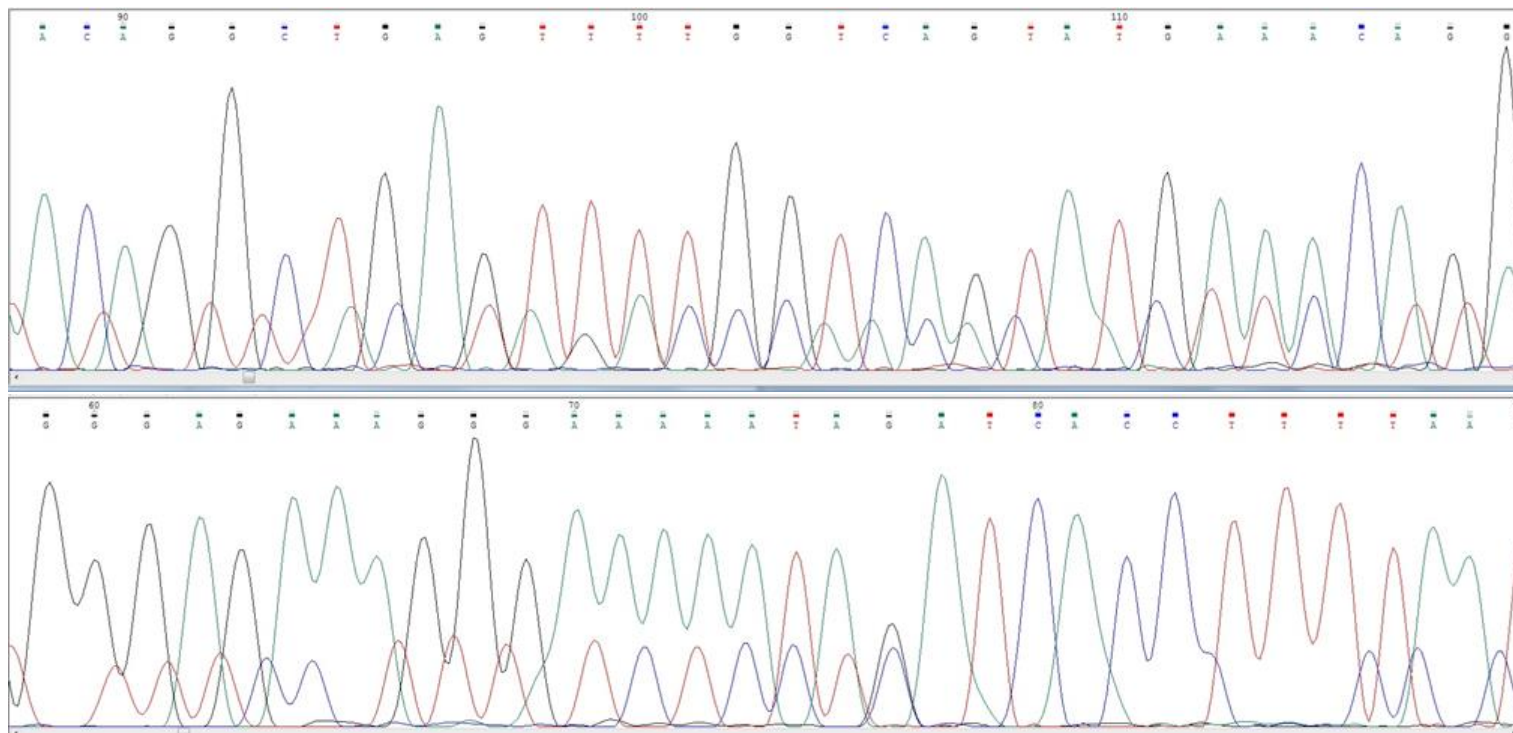
Sanger



Secuenciación Sanger

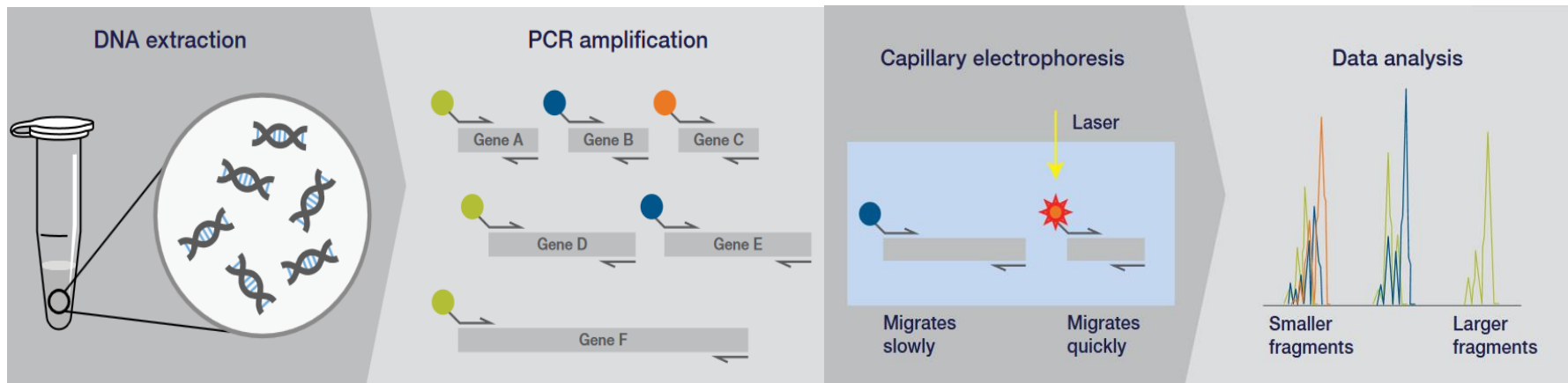


Secuenciación Sanger



Análisis de fragmentos

Análisis de fragmentos



Aplicaciones

- Estudio de marcadores microsatélites
 - Estudio de inestabilidad de microsatélites
 - Estudio paternidad
- Estudio de clonalidad genes IG y TCR
- MLPA
- Expansión de tripletes
- Genotipado de SNPs

MLPA

FORMACIÓN **IAVANTE** Fundación Progreso y Salud

CENTRO DE SIMULACIÓN CLÍNICA AVANZADA

@IAVANTE_FPS | #IAVANTEsimulación | www.iavante.es



Gracias por su atención

www.IAVANTE.es

IAVANTE