

¿Qué hacemos en un laboratorio de Biología Molecular?

José Antonio López-Guerrero
Laboratorio de Biología Molecular
Fundación Instituto Valenciano de Oncología



jalopez@fivo.org
[@jalopezg70](https://twitter.com/jalopezg70)



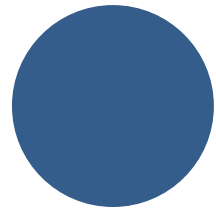
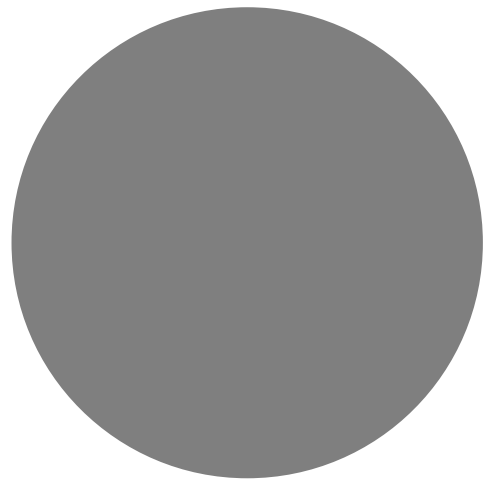
MAY 26, 2011 www.time.com AOL Keyword: TIME

TIME

THERE IS NEW AMMUNITION
IN THE WAR AGAINST
CANCER.
THESE ARE THE BULLETS.

Revolutionary new pills like **GLEEVEC** combat cancer by targeting only the diseased cells. Is this the breakthrough we've been waiting for?





El cáncer: una enfermedad genética

Formas genéticas del cáncer



Cáncer hereditario



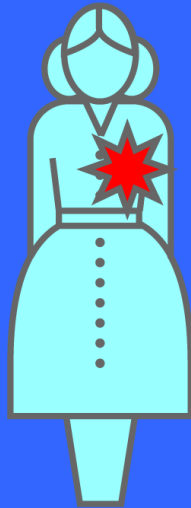
Cáncer esporádico

Formas genéticas del cáncer

Cáncer hereditario y cáncer esporádico

Mutaciones somáticas

- Se producen en el tejido no germinal
- No son heredables

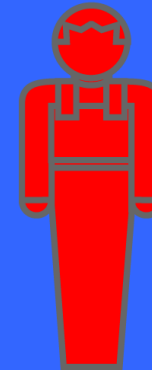


➔ No heredables

Mutaciones somáticas
(ej., mama)

Mutaciones germinales

- Presentes en los gametos
- Son heredables
- Causan los síndromes de cáncer familiar



Mutación en los
gametos

Afectan a todas las
células de la
descendencia

Cáncer hereditario

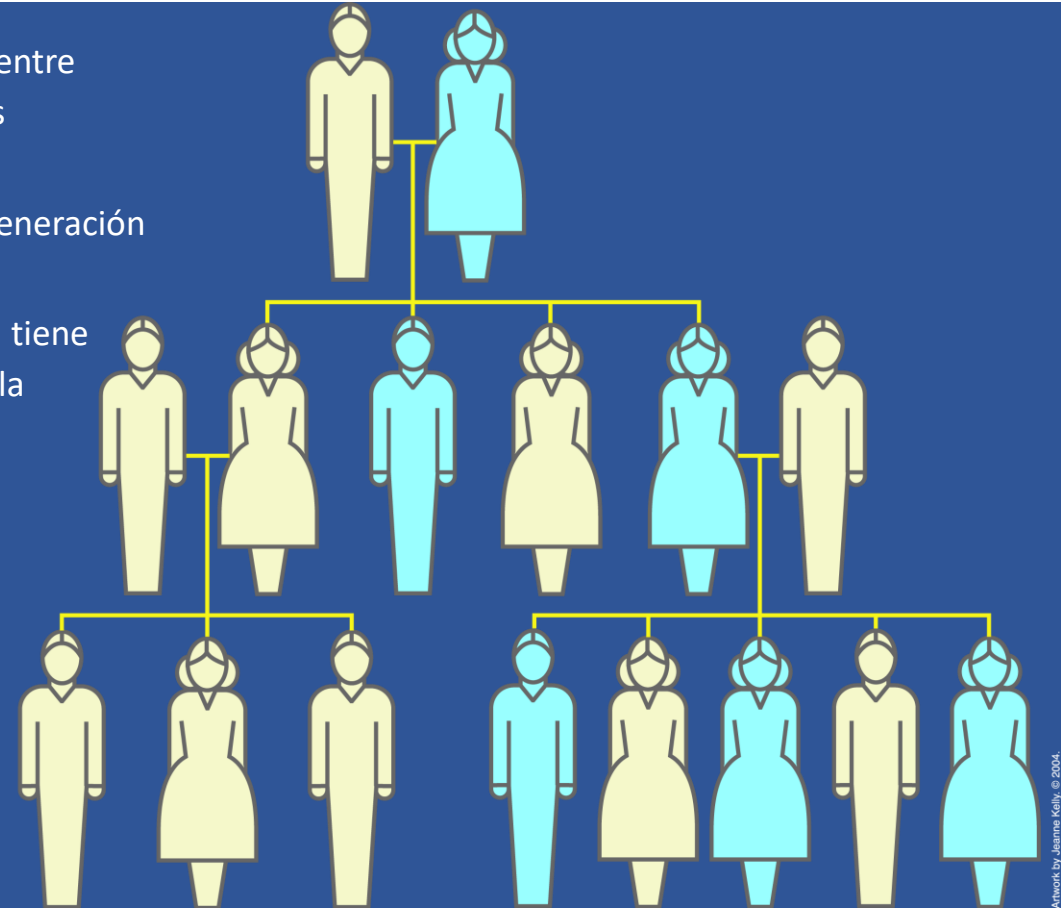
Herencia autosómica dominante

Se transmite igual entre hombres y mujeres

No salta ninguna generación

Cada descendiente tiene el 50% de heredar la mutación.

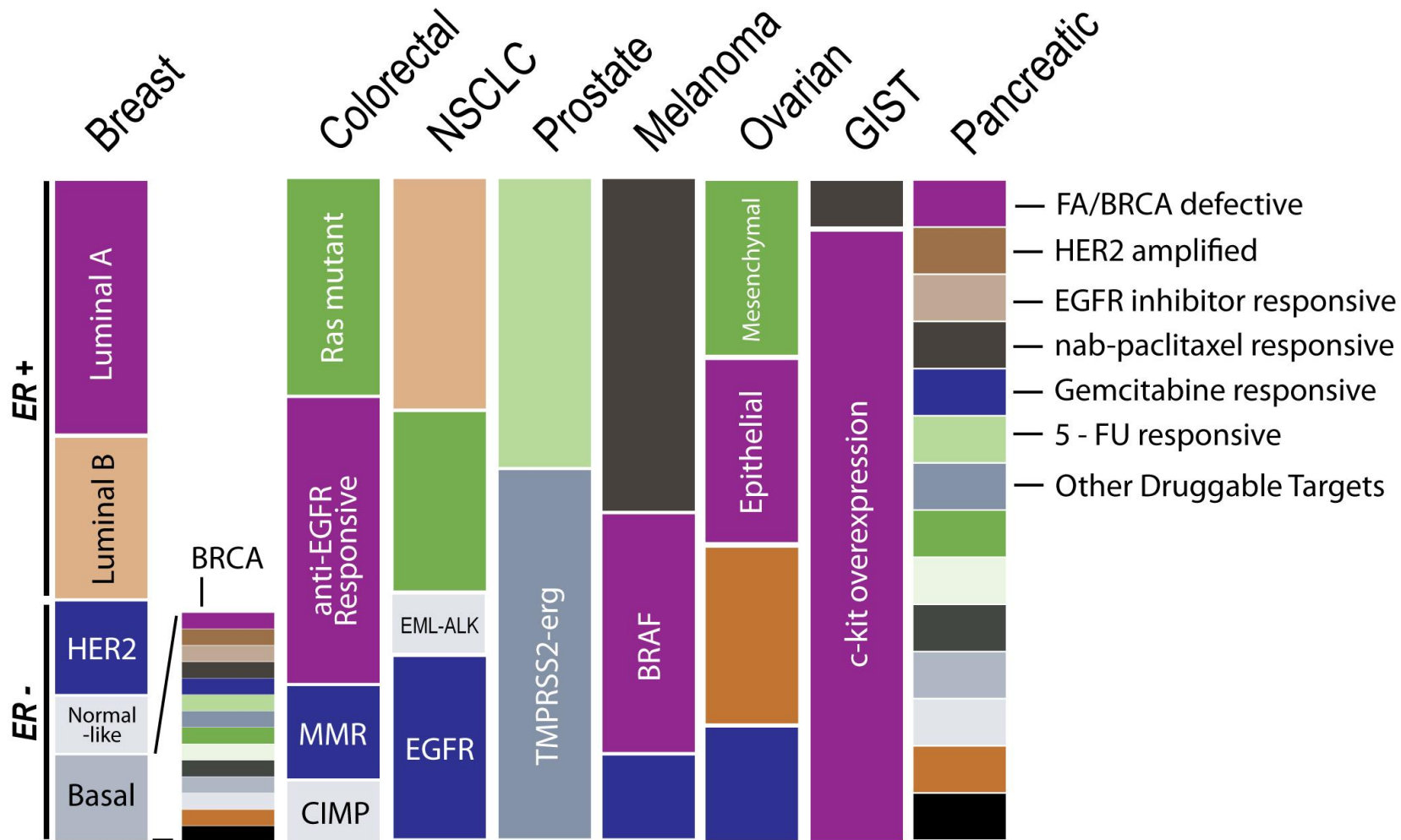
■ Normal
■ Afecto



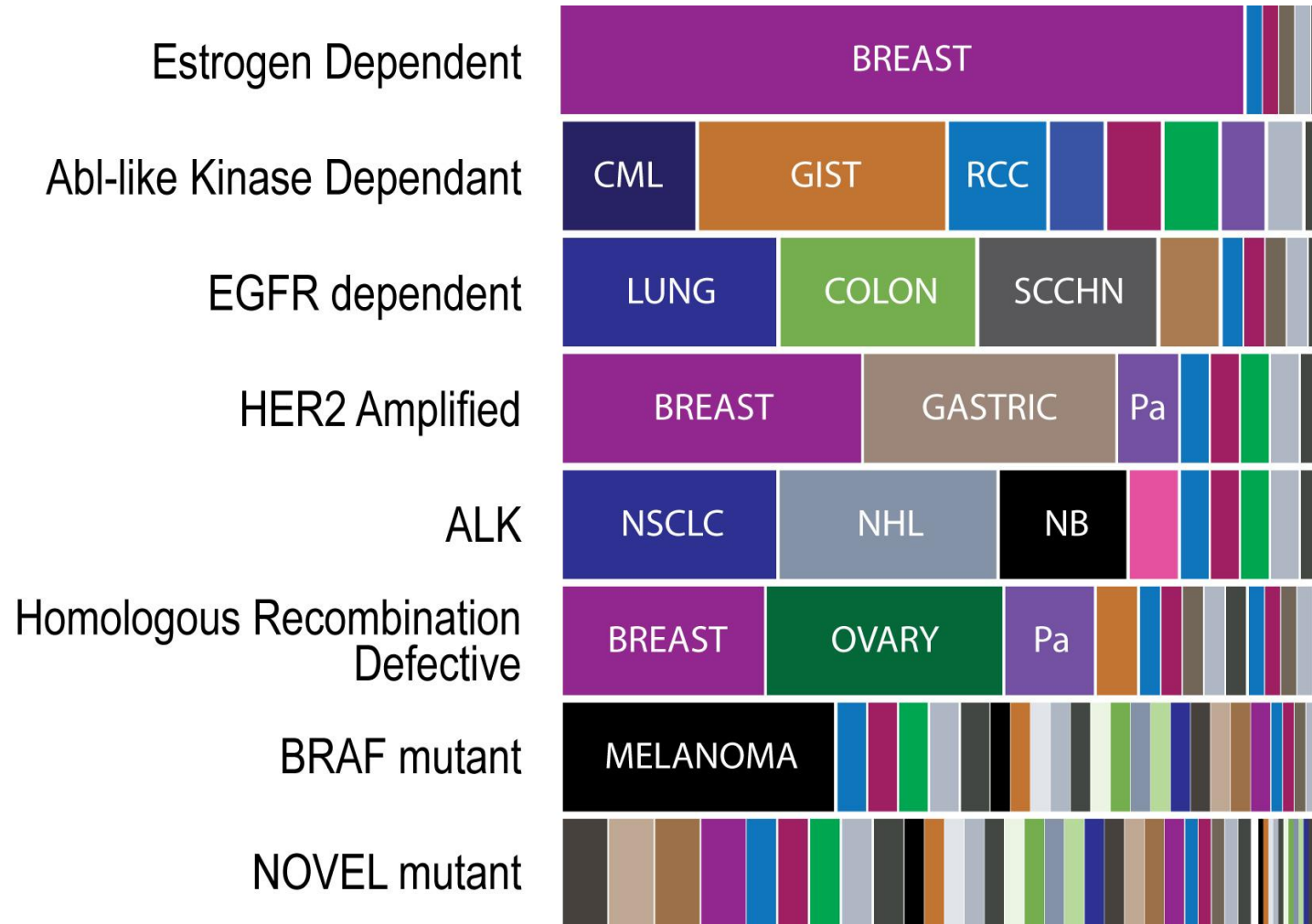
Syndrome	Associated Gene
Familial retinoblastoma	<i>RB1</i>
Li-Fraumeni	<i>TP53</i> (p53 protein)
Familial adenomatous polyposis	<i>APC</i>
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2</i>
Wilms' tumor	<i>WT1</i>
Breast and ovarian cancer	<i>BRCA1, BRCA2</i>
von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>
Cowden	<i>PTEN</i>

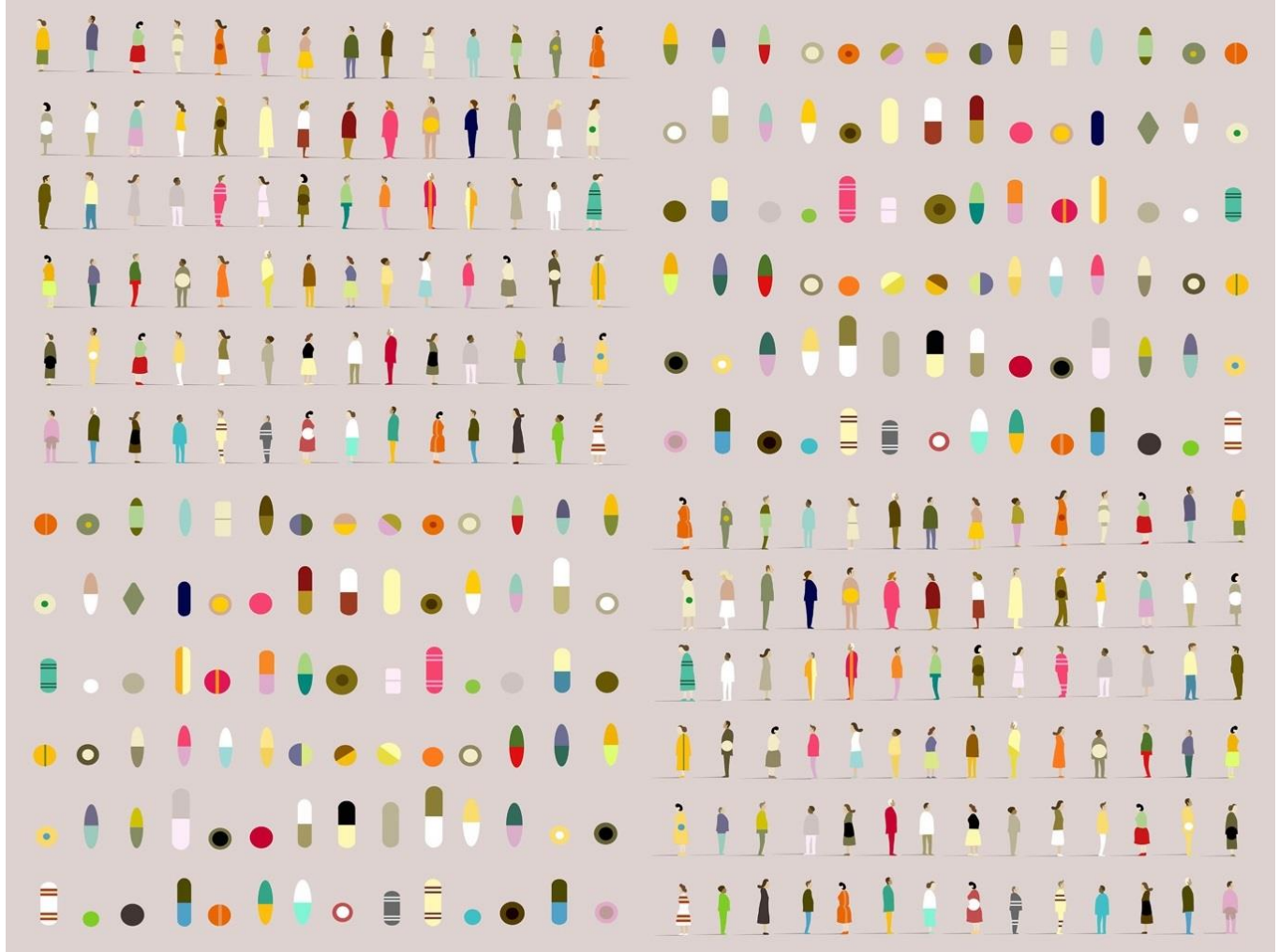
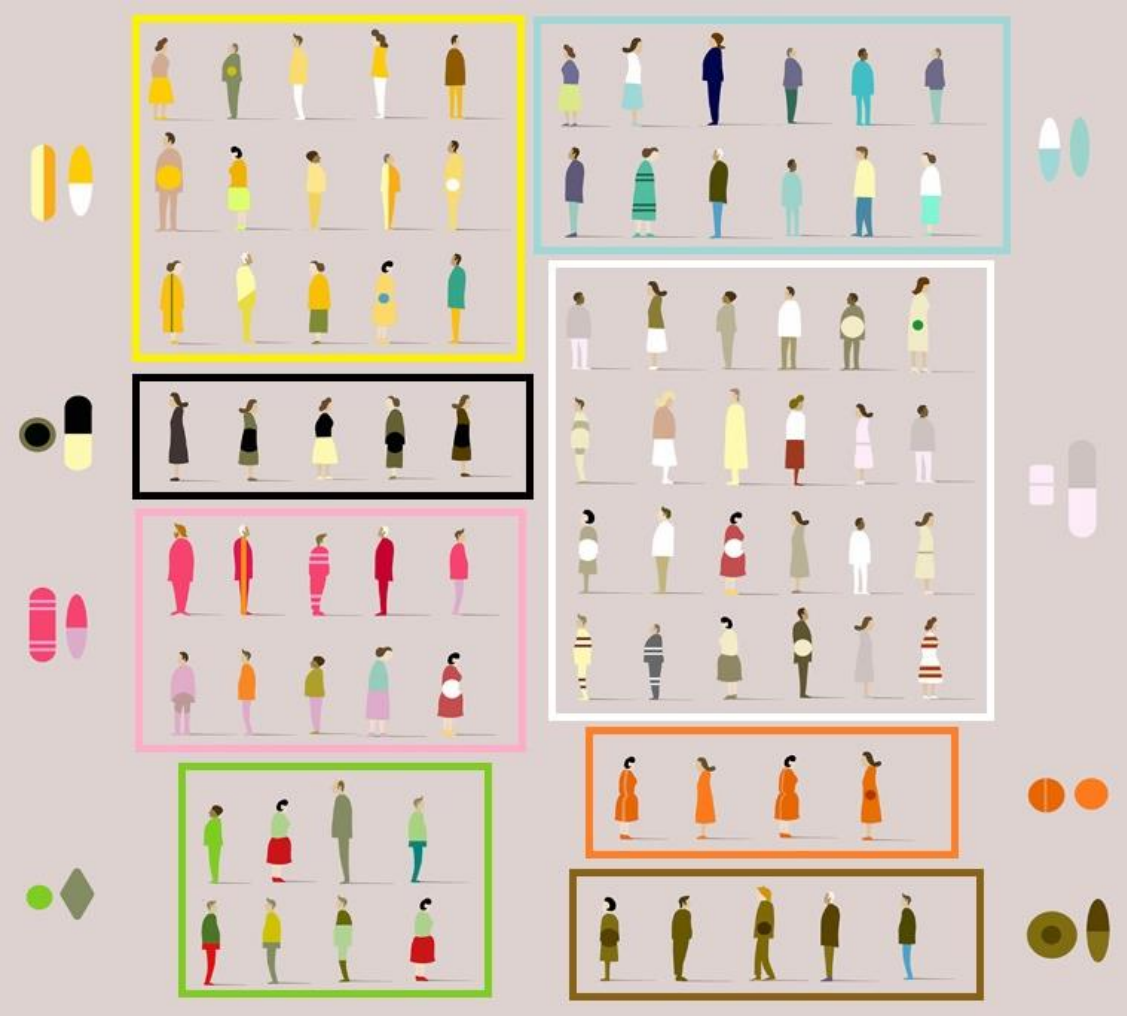
Artwork by Jeanne Kelly. © 2004.

Cáncer hereditario
Herencia
autosómica
dominante:
algunos ejemplos



Biotipos tumorales





MEDICINA DE PRECISIÓN

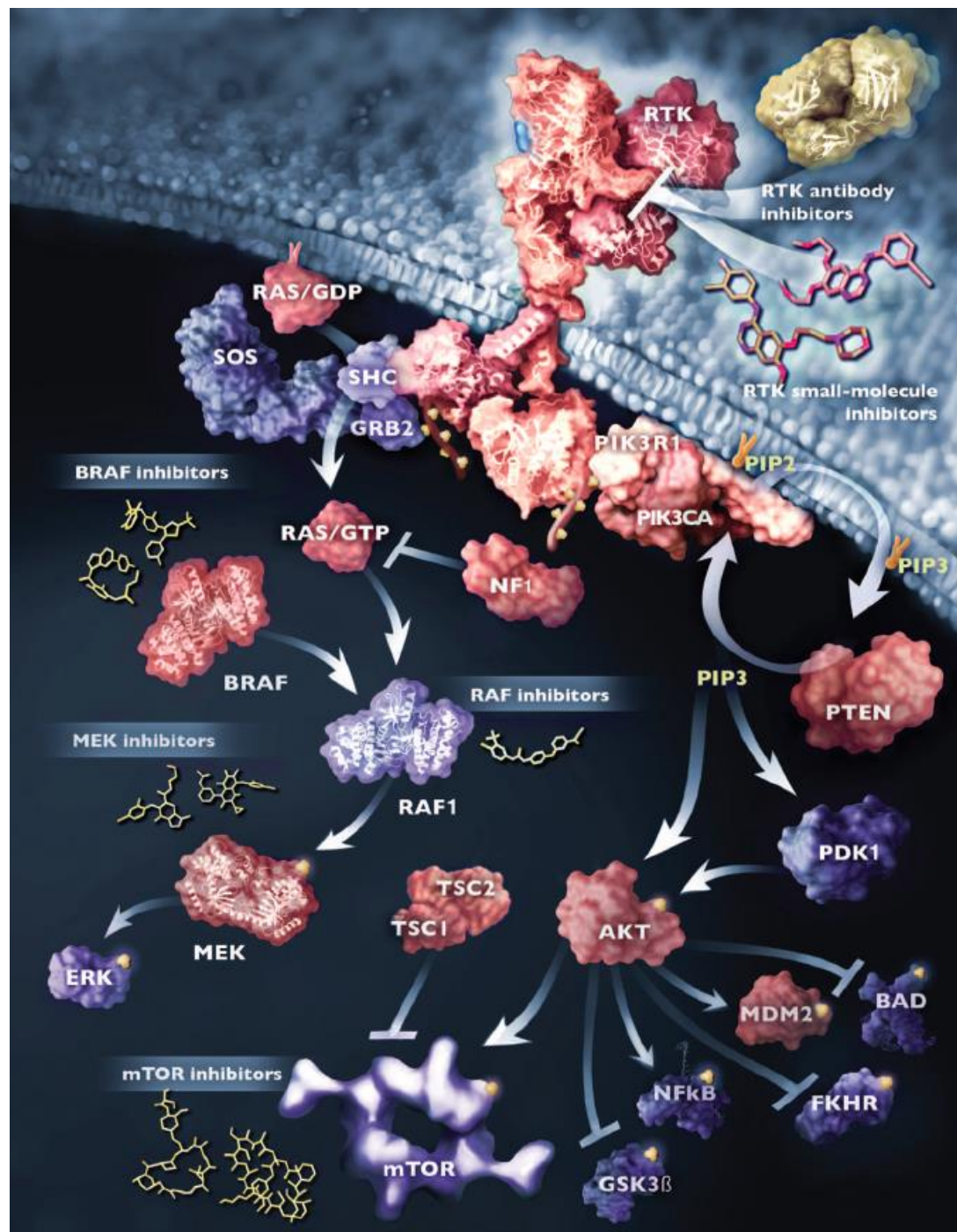
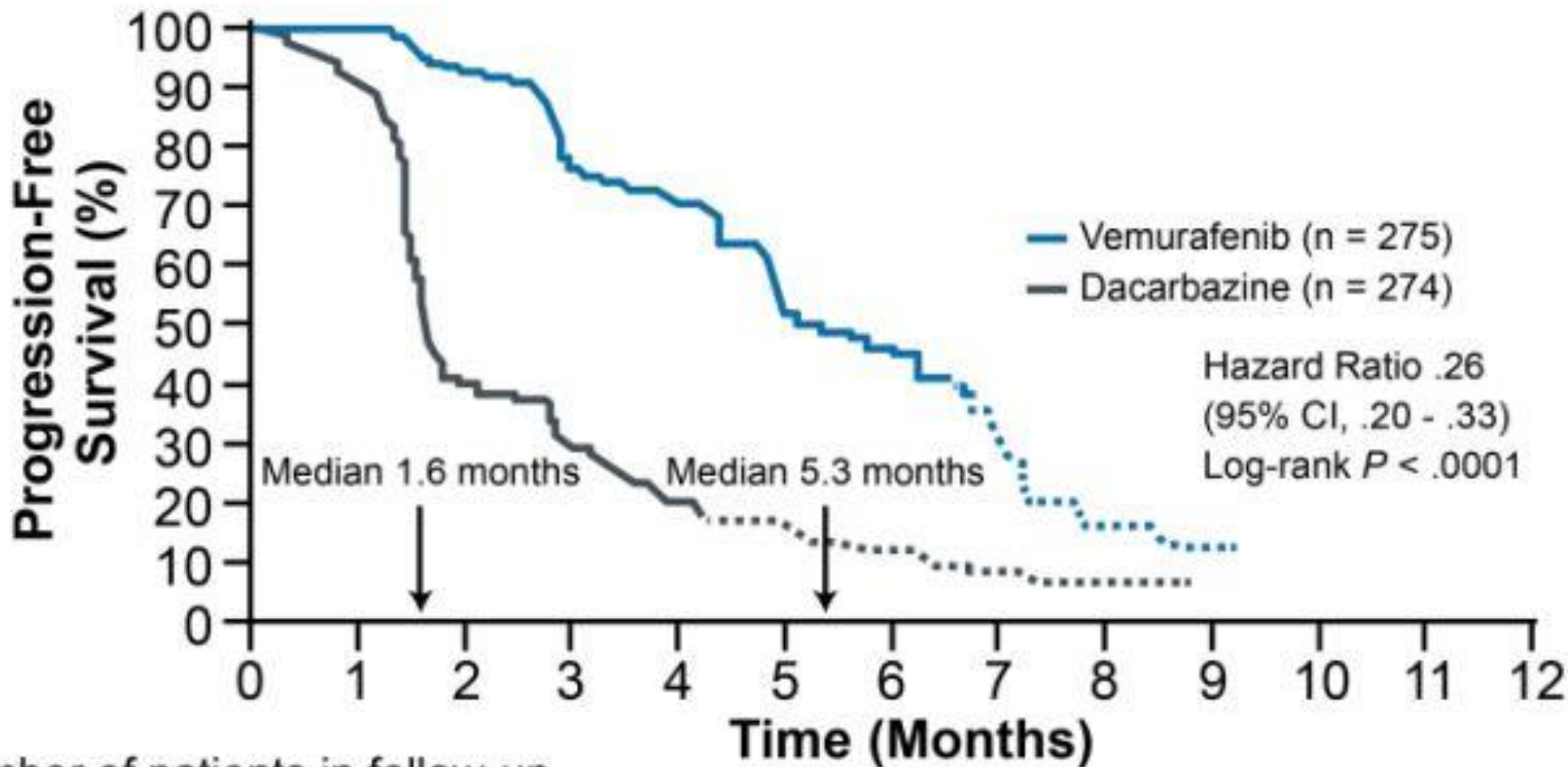


Table 1. Selected Genetic Markers and Their Application in Cancer Treatment

Genetic Marker	Application	Drug
BCR-ABL	Ph+ CML; Ph+ ALL	Imatinib, dasatinib, nilotinib
BCR-ABL/T315I	Resistance to anti-BCR-ABL agents	Imatinib, dasatinib, nilotinib
BRAF V600E	Metastatic melanoma	Vemurafenib
BRCA1/2	Metastatic ovarian cancer and breast cancer with BRCA 1/2 mutations	Olaparib, veliparib, iniparib
c-Kit	Kit (CD117)-positive malignant GIST	Imatinib
EGFR	Locally advanced, unresectable, or metastatic NSCLC	Erlotinib, gefitinib
EGFR T790M	Resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced NSCLC	Erlotinib, gefitinib
EML4-ALK	ALK kinase inhibitor for metastatic NSCLC with this fusion gene	Crizotinib
HER2 amplification	HER2-positive breast cancer or metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma	Trastuzumab
KRAS	Resistance to EGFR antibodies in metastatic colorectal cancer	Cetuximab, panitumumab
PML/RAR	Acute promyelocytic leukemia	ATRA, arsenic trioxide
TPMT	Deficiency is associated with increased risk of myelotoxicity	Mercaptopurine, azathioprine
UGT1A1	Homozygosity for UGT1A1*28 is associated with risk of toxicity	Irinotecan
DPD	Deficiency is associated with risk of severe toxicity	5-Fluorouracil

ATRA, all trans retinoic acid; Ph+, Philadelphia-positive chromosome; DPD, dihydropyrimine dehydrogenase; EGFR, epidermal growth factor receptor; EML4-ALK, echinoderm microtubule-associated protein-like 4 anaplastic lymphoma kinase; HER2, human epidermal growth receptor 2; GIST, gastrointestinal stromal tumors; ALL, acute lymphocytic leukemia; NSCLC, non-small cell lung cancer; TPMT, thiopurine S-methyltransferase.

Progression-Free Survival



Number of patients in follow-up

Dacarbazine	274	213	85	48	28	16	10	6	3	0
Vemurafenib	275	268	211	122	105	50	35	16	4	3

¿Qué hacemos
en el laboratorio
de Biología
Molecular del
IVO?



iivo

Unidad de Consejo Genético

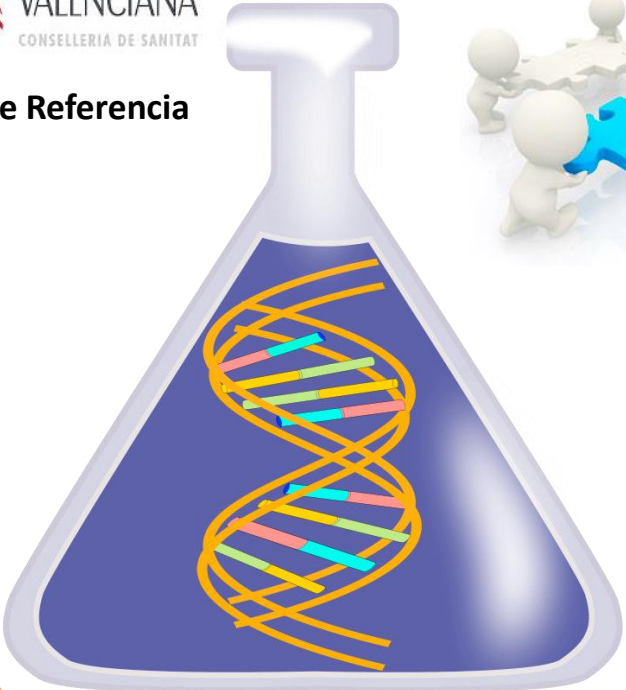
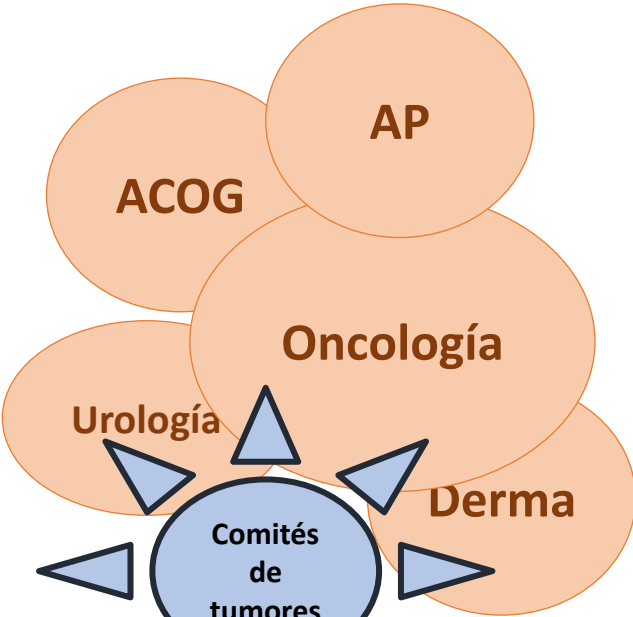


Laboratorio de Referencia

Equipo humano

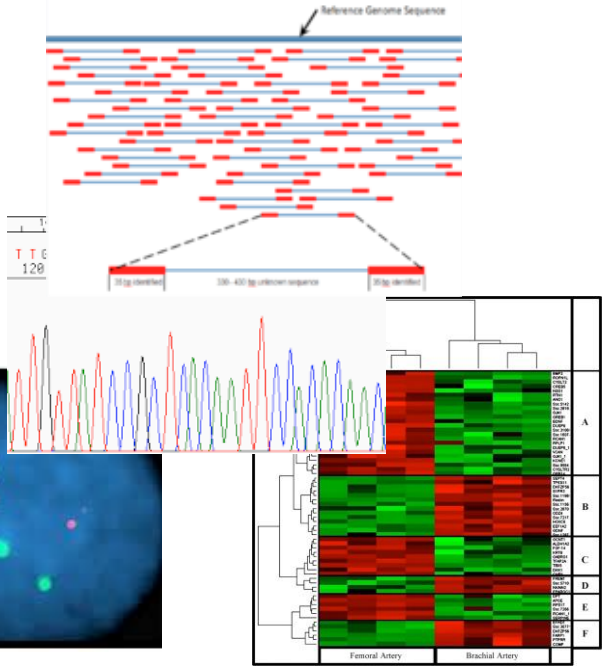


- 4 Biólogos Moleculares (Dr.)
- 2 técnicos (AP)
- 1 Secretaria



Servicio Central

Infraestructura



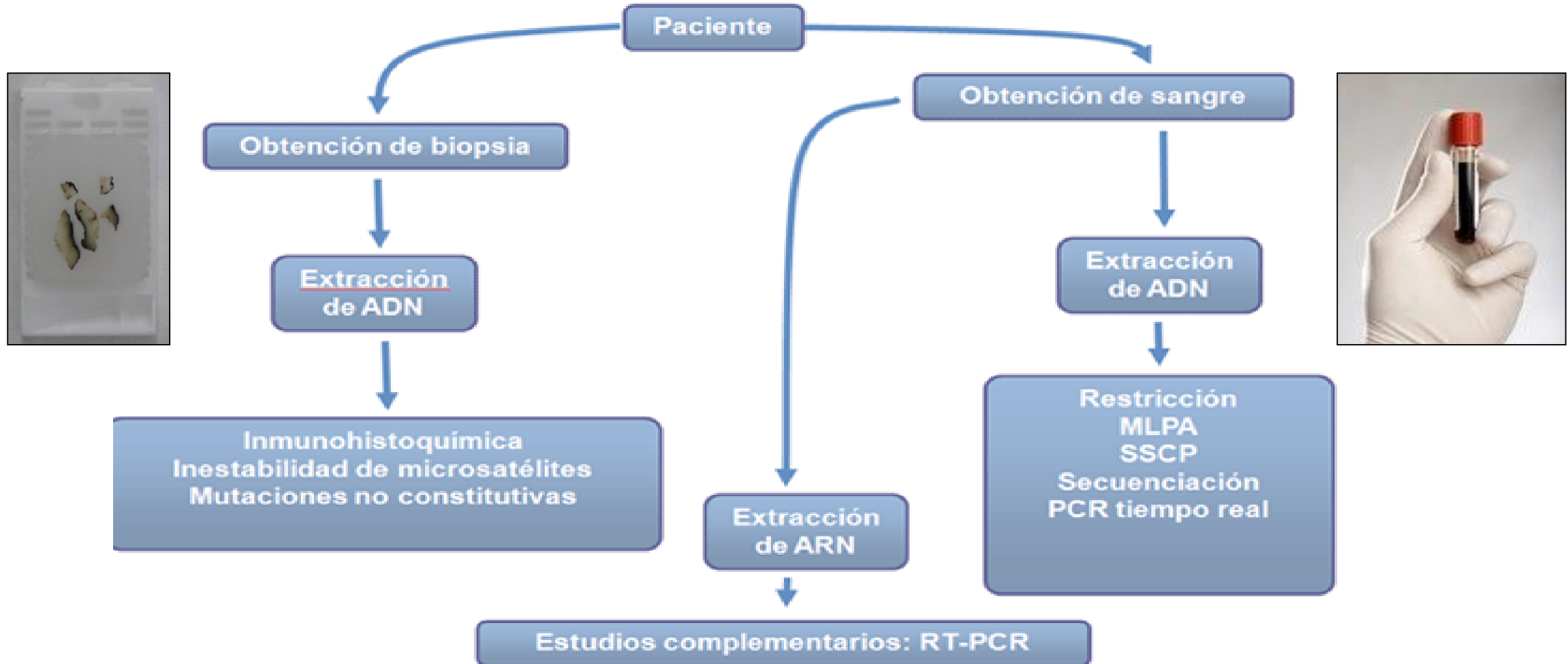
EECC

Mutaciones somáticas (tumor):

- adquiridas durante la vida
- detectadas en tumor
- posibles dianas terapéuticas en cáncer

Mutaciones en línea germinal:

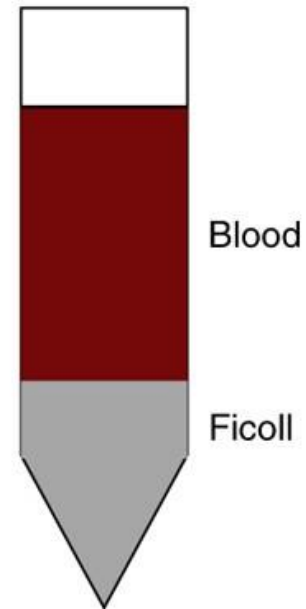
- presentes desde el nacimiento
- presentes en todas las células
- pueden indicar predisposición a cáncer



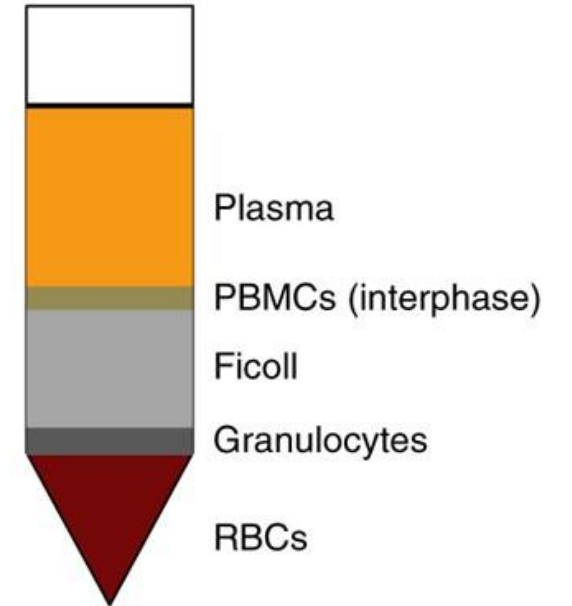
Aislamiento del ADN línea germinal



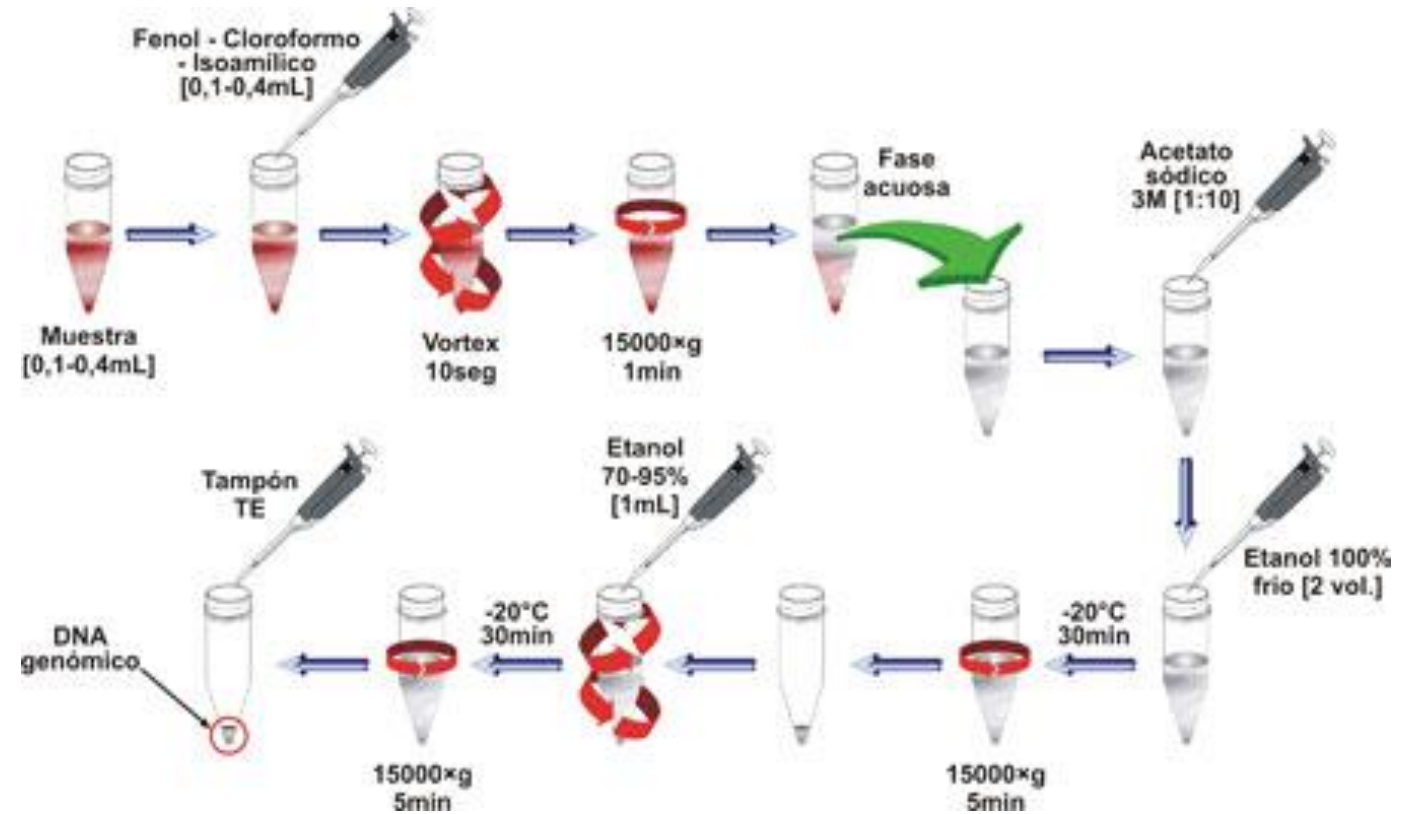
Layers before Ficoll spin



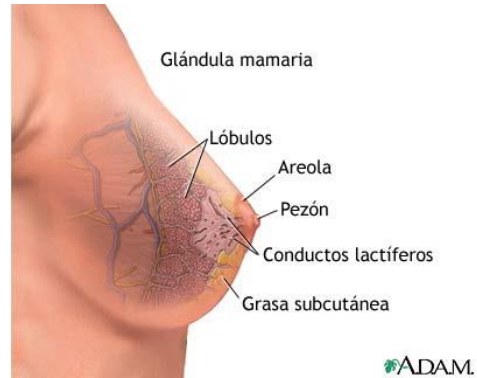
Layers after Ficoll spin



Aislamiento del ADN línea germinal

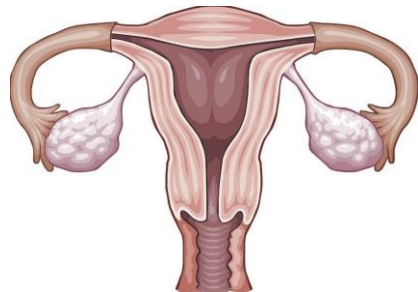


Cáncer de Mama con criterios familiares



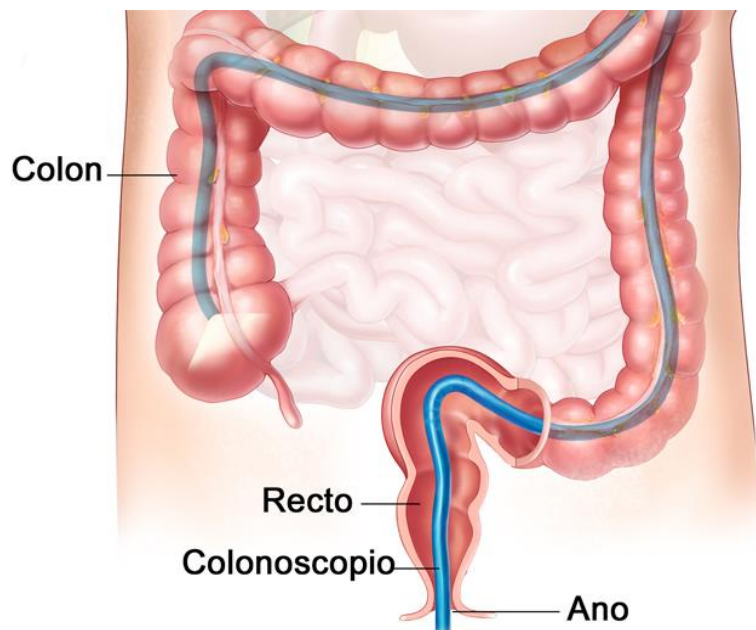
<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>BRCA1/BRCA2</i>	Predisposición hereditaria (CMOH)	Sangre	NGS y MLPA

Cáncer de Ovario

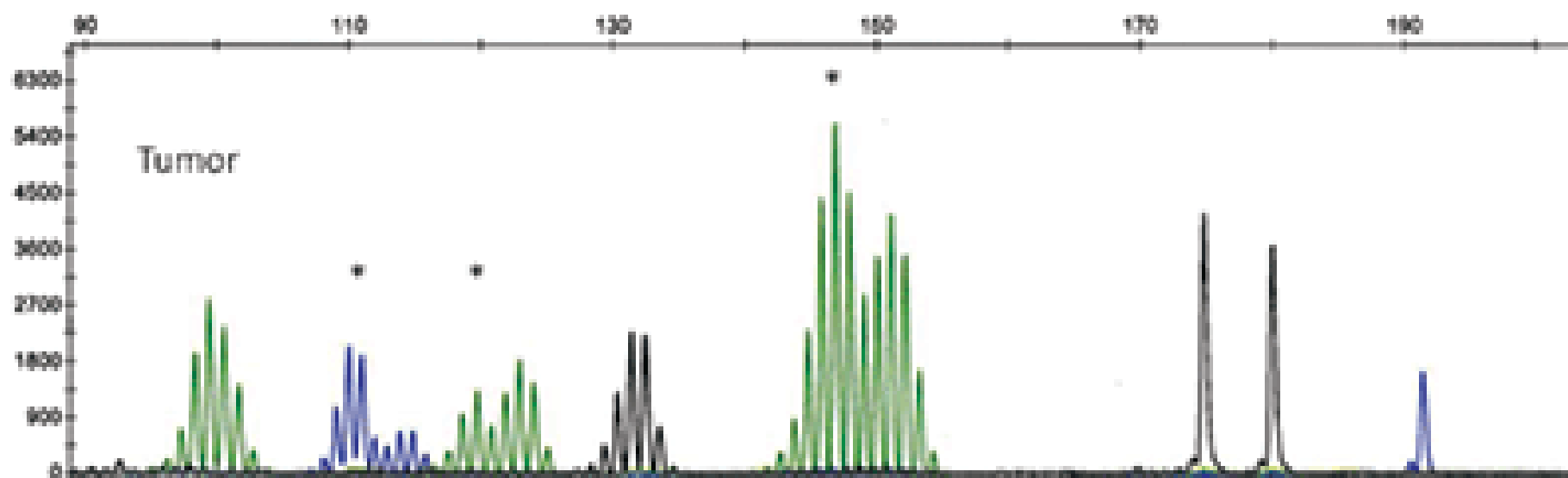
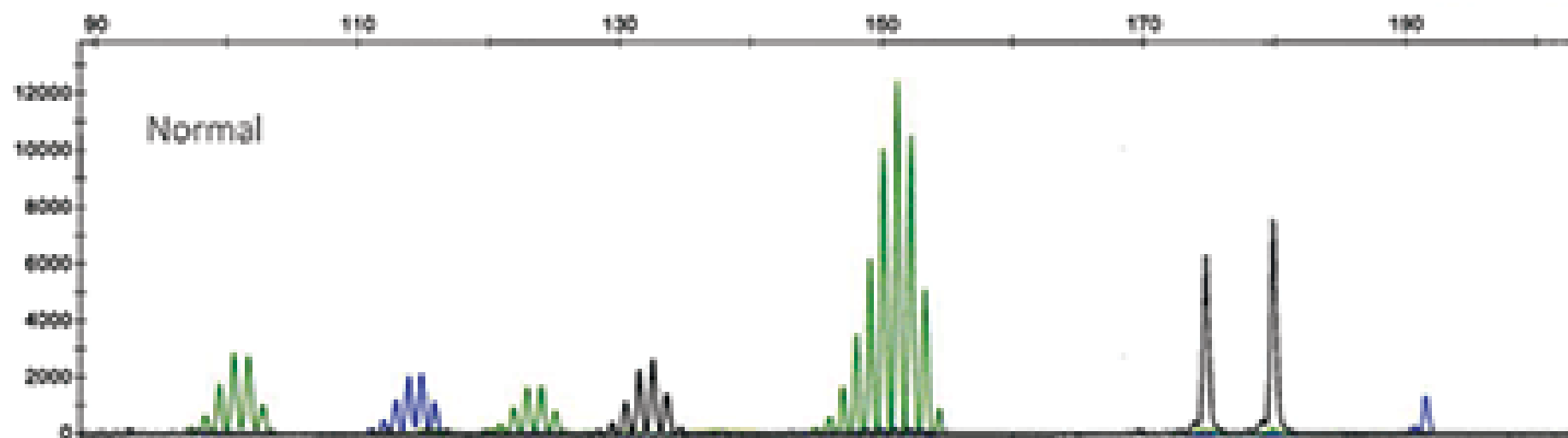


<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>BRCA1/BRCA2</i>	Predisposición hereditaria (CMOH) Diana terapéutica	Sangre/Tumor	NGS y MLPA

Cáncer colorrectal

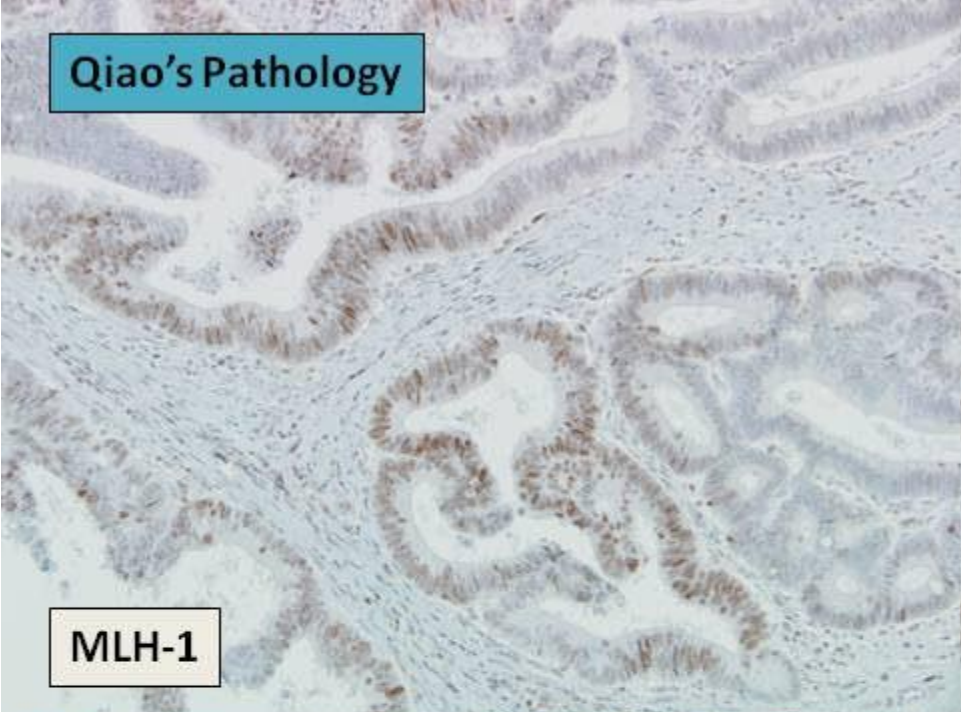


<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>KRAS</i>	Resistencia a tratamiento	Tumor	Q-PCR y Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>NRAS</i>	Resistencia a tratamiento	Tumor	Secuenciación Sanger
Mutación <i>BRAF</i> V600E	Valor pronóstico	Tumor	Q-PCR
MSI	Resistencia a tratamiento Valor pronóstico	Tumor±Sangre	Análisis de fragmentos

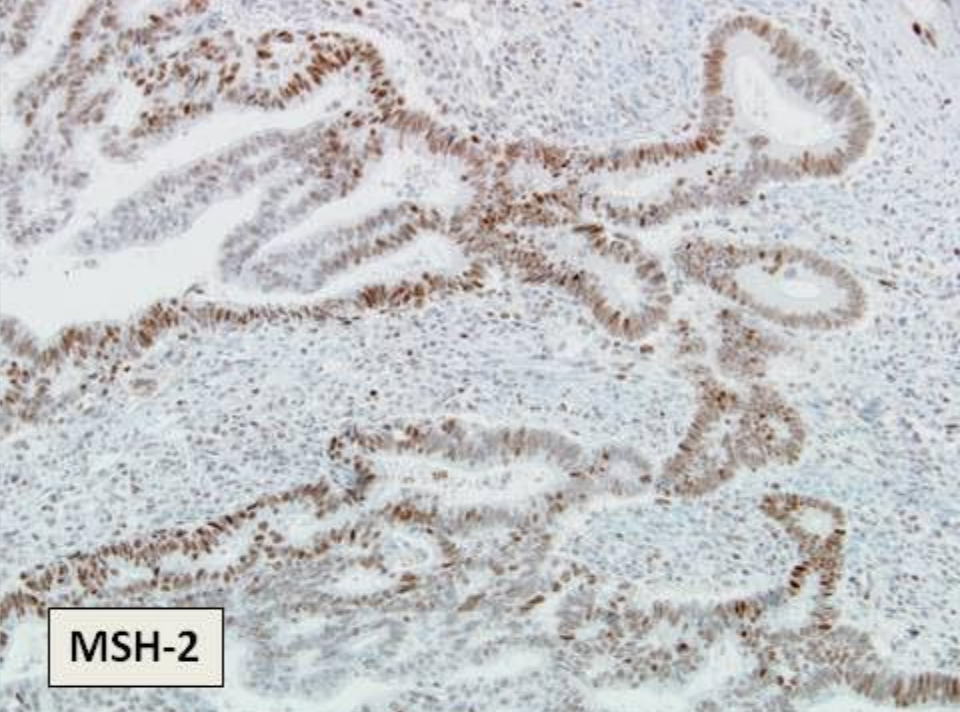


NR- 21 BAT-26 BAT-25 NR-24 MONO-27 Penta D Penta C

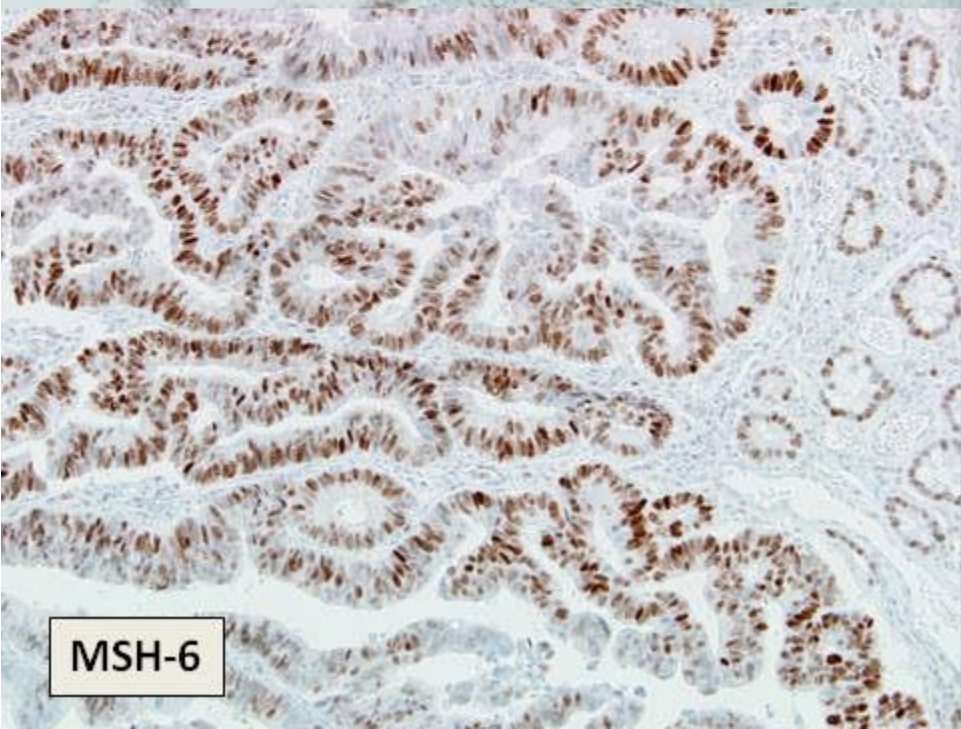
Qiao's Pathology



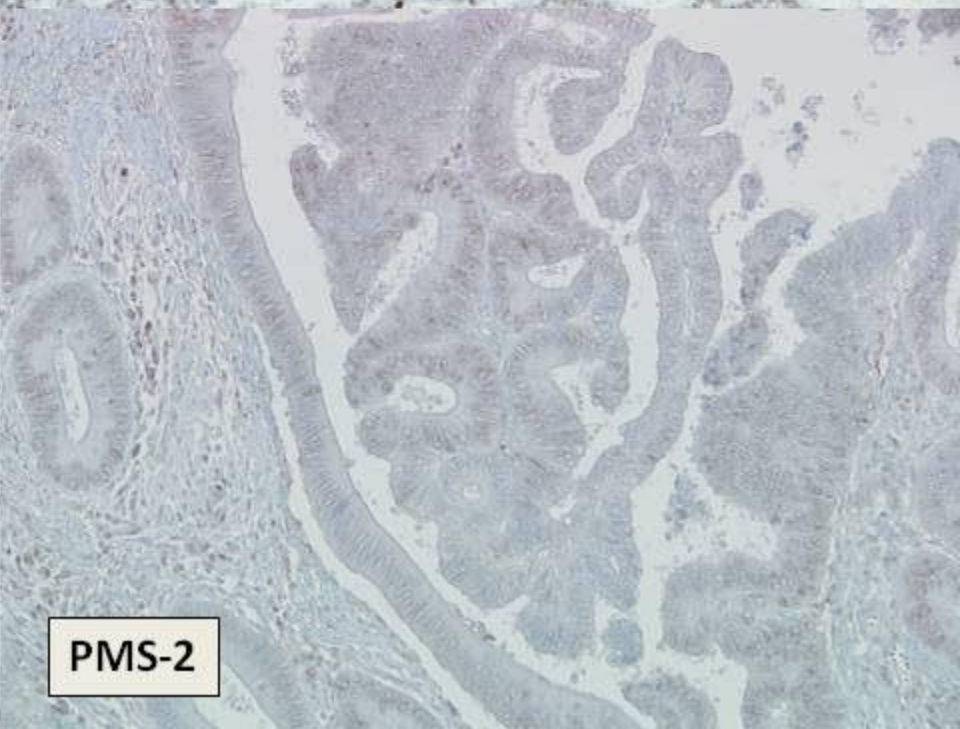
MLH-1



MSH-2



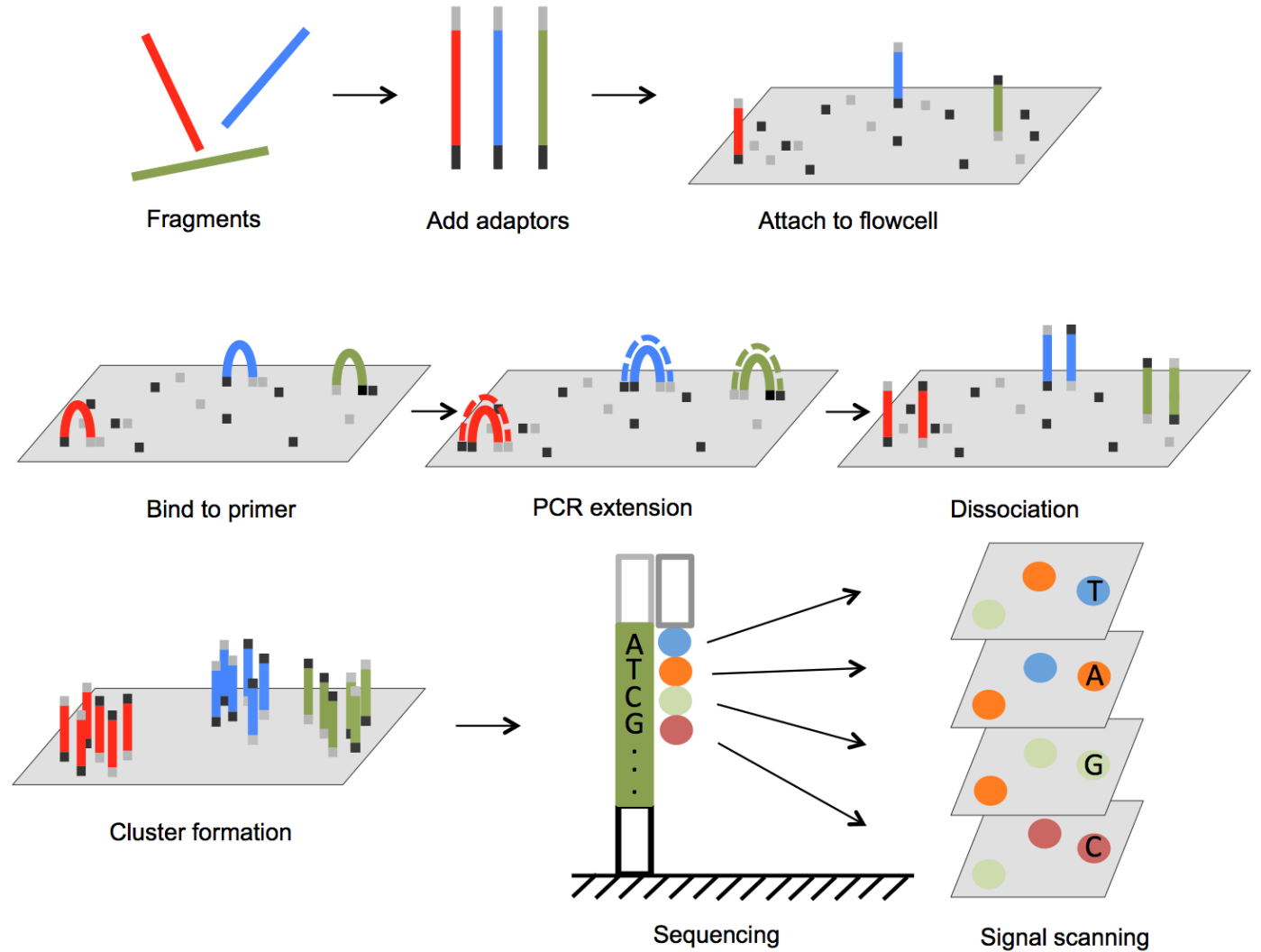
MSH-6



PMS-2

n	Características Clínico-Patológicas
1 caso de cáncer en la familia	<p>Cáncer de mama y Cáncer de ovario sincrónico o metacrónico en la misma persona</p> <p>Cáncer de mama diagnosticado antes de los 35 años</p> <p>Cáncer de mama bilateral, cuando el 1º fue diagnosticado antes de los 40 años</p> <p>Cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años</p> <p>Carcinoma de ovario seroso-papilar de alto grado</p>
2 casos de cáncer en la familia	<p>Cáncer de mama bilateral + Cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años</p> <p>1 cáncer de mama en el varón</p> <p>Cáncer de mama + Cáncer de ovario</p> <p>2 Cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años</p>
≥3 casos de cáncer en la familia	<p>≥3 casos de cáncer de mama y/o cáncer de ovario (independientemente de la edad)</p>

Análisis de mutaciones en BRCA1/2 por NGS y MLPA



BRCA

2 genes

1

REPORTED

1

BRCA MASTR™ Dx
germline

OVERVIEW SCREENING GENES **SNPs-INDELS** CNVs WARNINGS

Static Filters

Retained

24

A: Most Likely Patho...

2

B: Potentially Patho...

1

C: VUS (Unknown ...

6

D: Likely Benign

15

Low Confidence

12

Flagged

11

Custom Filters

Variant List - sorted by: PRED_CAT > PATHOGENICITY_CLASS > GENE

P...	Pat	id	type	cod. cons.	gene	refSeqId	c.DNA	Protein	VP%	refSeq	altSeq	depth	SC
C	5	29	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.4485-63C>G		49.87			770	
C	5	27	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.4987-68A>G		53.63			716	
C	2	2	SNP	missense	BRCA1	NM_007294	c.2077G>A	p.Asp693Asn	51.43	GAC	AAC	525	
C	2	33	SNP	5'UTR	BRCA2	NM_000059	c.-26G>A		50.0			1020	
C	1	25	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.5152+66G>A		51.94			258	
C	1	18	INDEL	intronic	BRCA2	NM_000059	c.6841+80_...		51.14			1095	
C		36	SNP	5'UTR	BRCA1	NM_007294	c.-134T>C		55.74			540	
C		26	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.5075-53C>T		55.41			231	
C		32	INDEL	intronic	BRCA1	NM_007294	c.548-58delT		51.32			793	
C		31	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.4097-141A...		46.97			264	
C		28	SNP	intronic	BRCA1	NM_007294	c.4987-92A>G		53.63			716	

OVERVIEW DETAILS COMMENTS VIEWER SIMILAR PATIENTS WARNINGS

reads: 716 DEPTH (231 min, 6491 max)

frequencies: 4/11 RUN (24%) ACCOUNT (53.4%) COMMUNITY

flagging: 13 (D, C, B, A)

transcript: NM_007294
cDNA: c.4987-68A>G
refSeq: T->C
rs number: rs8176234

SNP: 17-16 intronic

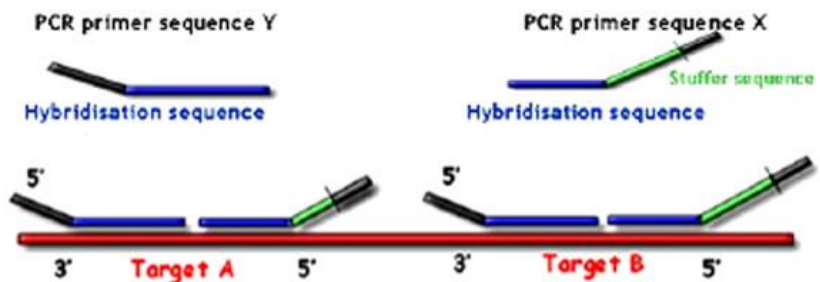
In Report: 2
Set To False: 0

SNP BRCA1

ExAC ClinVar COSMIC IGV NCBI ALAMUT

Values are scaled so that the most pathogenic scores are plotted towards the external circle. ESP5400 & G1000 empty values are considered as 0.0

1. Denaturation and Hybridisation



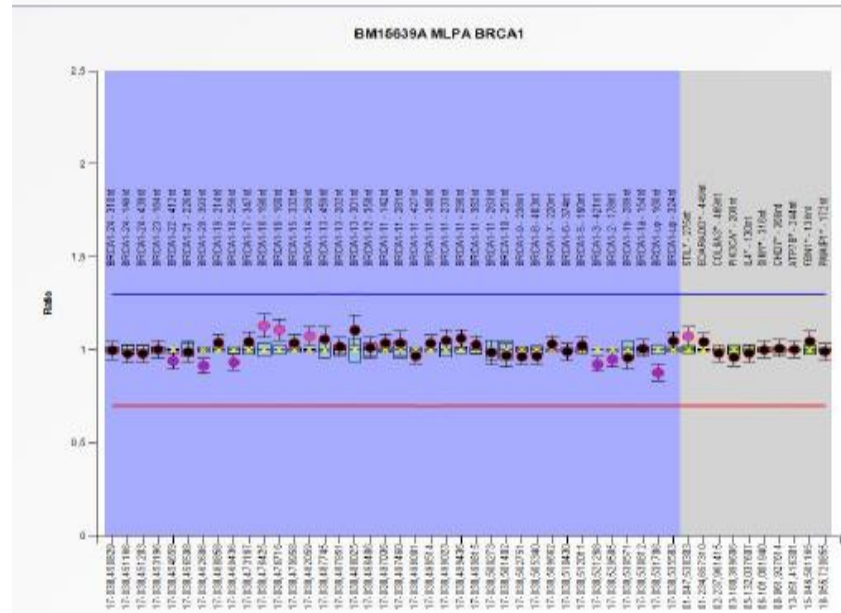
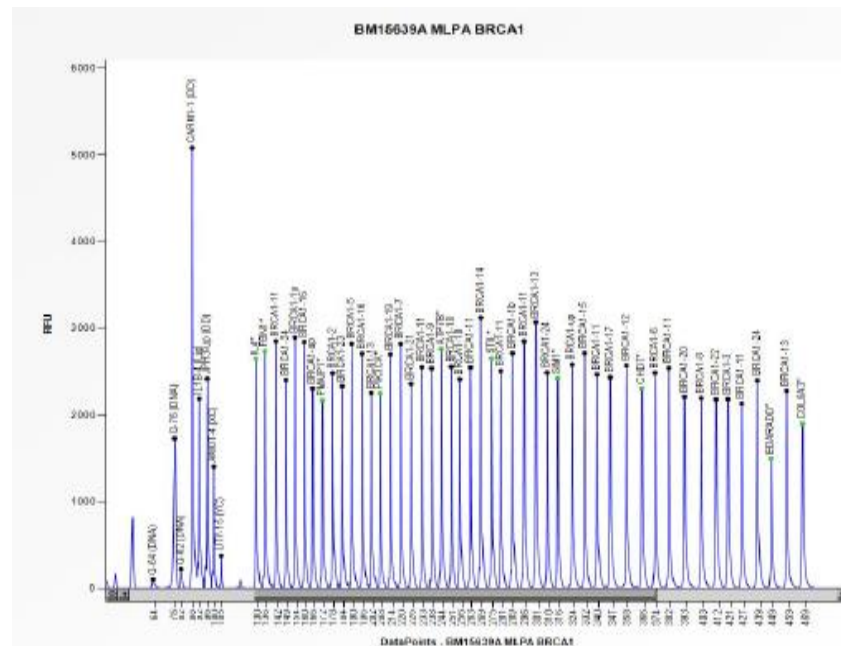
2. Ligation



3. PCR: All probe ligation products are amplified by PCR using only one primer pair



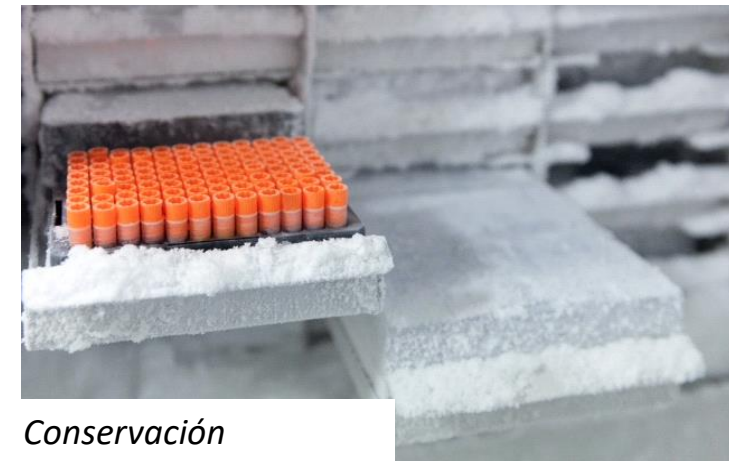
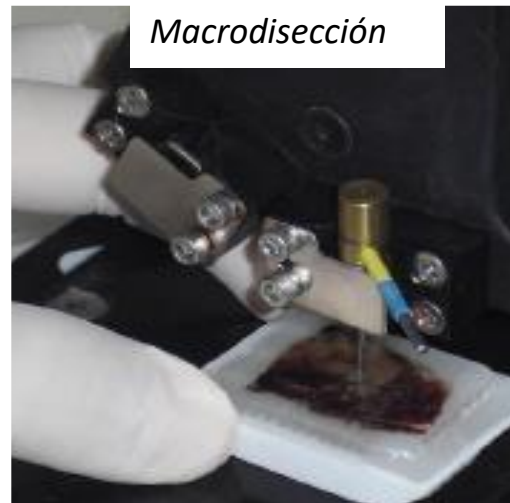
4. Fragment analysis



Aislamiento del ADN tumoral



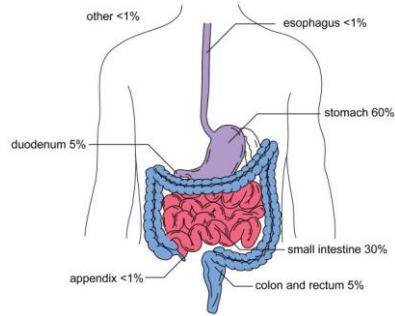
Revisión histológica



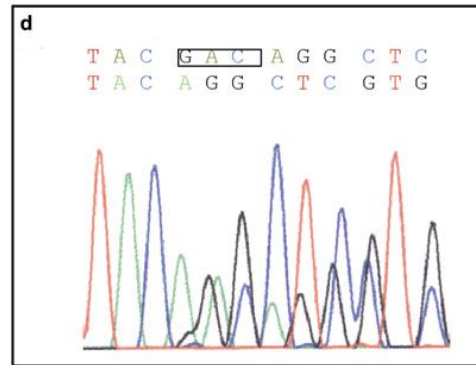
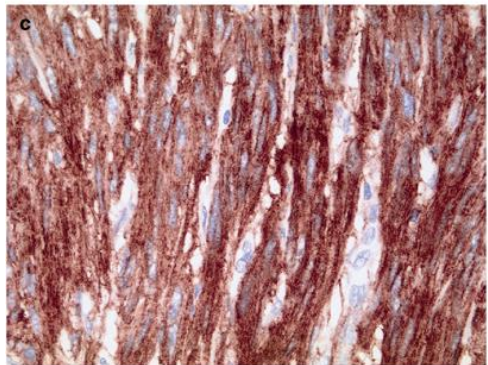
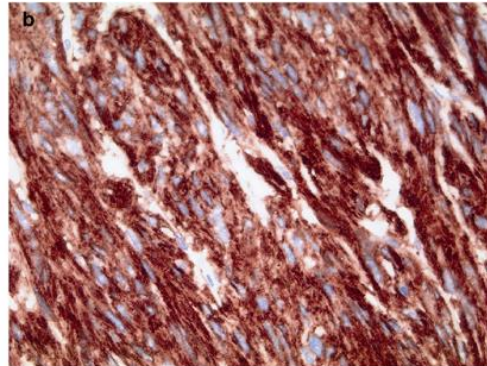
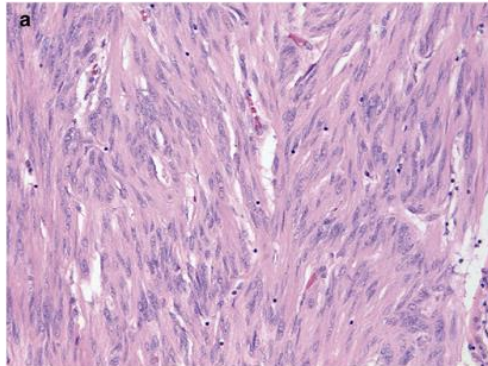
Aislamiento del ADN tumoral



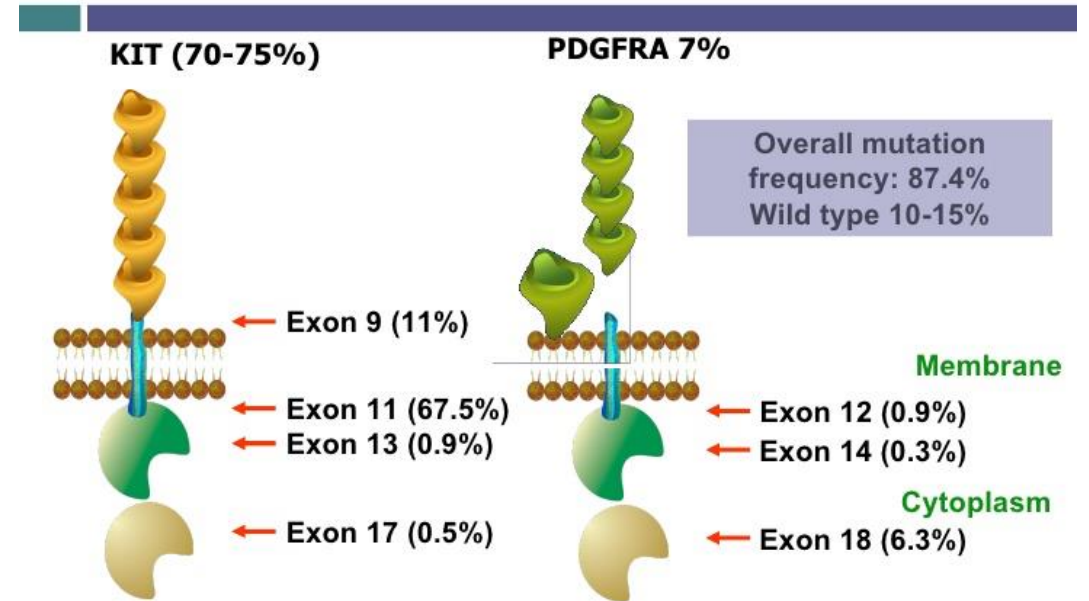
GIST



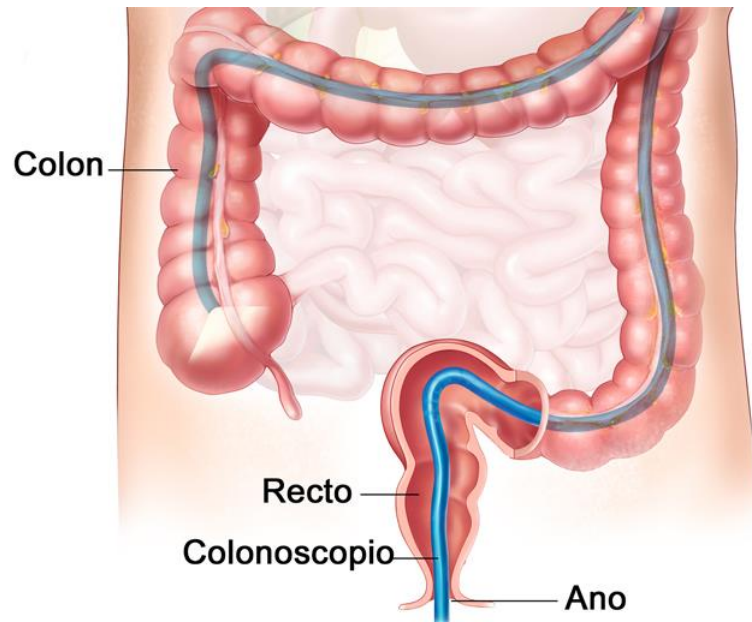
Alteración molecular	Utilidad Clínica	Muestra de partida	Técnica
Mutaciones <i>c-KIT</i>	Diana terapéutica	Tumor	Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>PDGFRA</i>	Diana terapéutica	Tumor	Secuenciación Sanger



KIT and PDGFRA Mutations in GIST

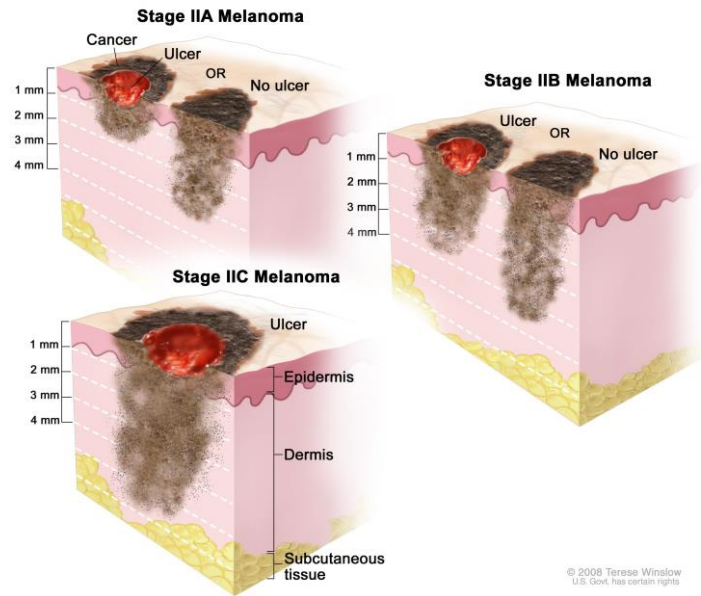


Cáncer colorrectal



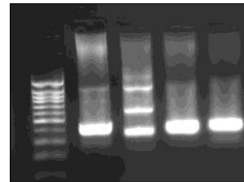
<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>KRAS</i>	Resistencia a tratamiento	Tumor	Q-PCR y Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>NRAS</i>	Resistencia a tratamiento	Tumor	Secuenciación Sanger
Mutación <i>BRAF</i> V600E	Valor pronóstico	Tumor	Q-PCR
MSI	Resistencia a tratamiento Valor pronóstico	Tumor±Sangre	Análisis de fragmentos

Melanoma



<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>c-KIT</i>	Diana terapéutica	Tumor	Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>BRAF</i>	Diana terapéutica Valor pronóstico	Tumor	Q-PCR y Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>NRAS</i>	Diana terapéutica Valor pronóstico	Tumor	Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>CDKN2A</i>	Predisposición hereditaria	Sangre	Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>CDK4</i>	Predisposición hereditaria	Sangre	Secuenciación Sanger
Mutaciones <i>MITF</i>	Predisposición hereditaria	Sangre	Secuenciación Sanger
Polimorfismos <i>MC1R</i>	Valor pronóstico	Sangre	Secuenciación Sanger

Análisis de *NRAS* mediante secuenciación Sanger

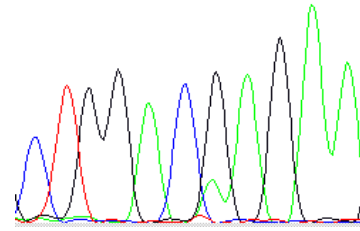


241 CTTGCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTCCTGTTGGGA
ATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTTGGTGGGA
M--T--E--Y--K--L--V--V--G--A--G=C--V--G--
 ★ ★
 12 13

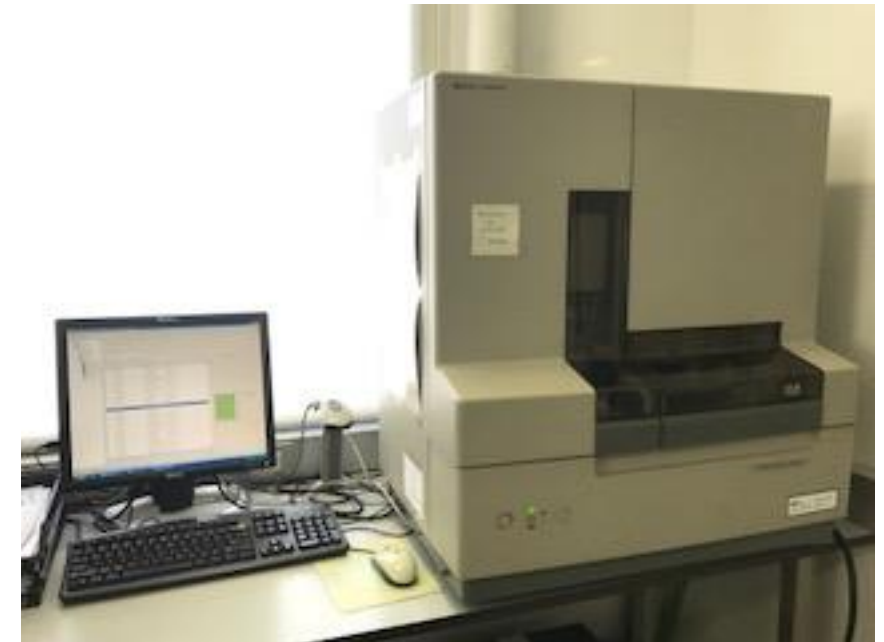
301 AAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCCACGA
 47 AAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCCACCA
 16 K--S--A--L--T--I--Q--L--I--Q--N--H--F--V--D--E--Y--D--P--T--

361 TAGAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATAC
 107 TAGAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGTGGACATAC
 36 I--E--D--S--Y--R--K--Q--V--V--I--D--G--E--T--C--L--L--D--I--

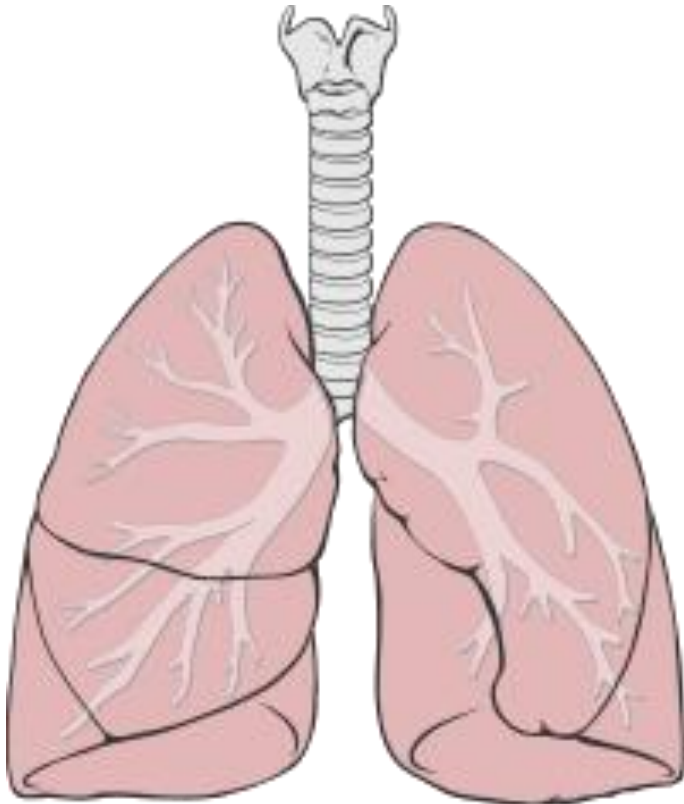
421 TGGATACAGCTGGACAGAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCG
 167 TGGATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCG
 56 L--D--T--A--G--Q--E--E--Y--S--A--M--R--D--Q--Y--M--R--T--G--
 ★ ★
 59 61



↑
p.Q61R / c.182 A>G

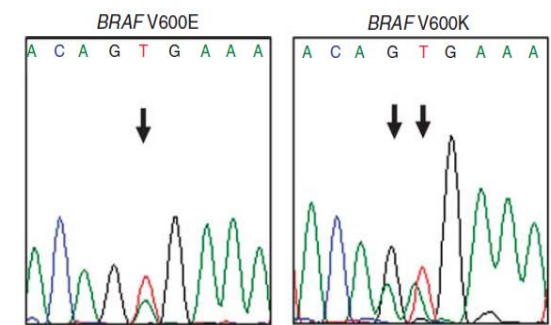
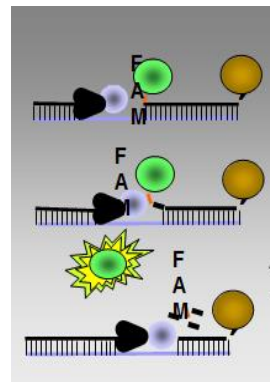
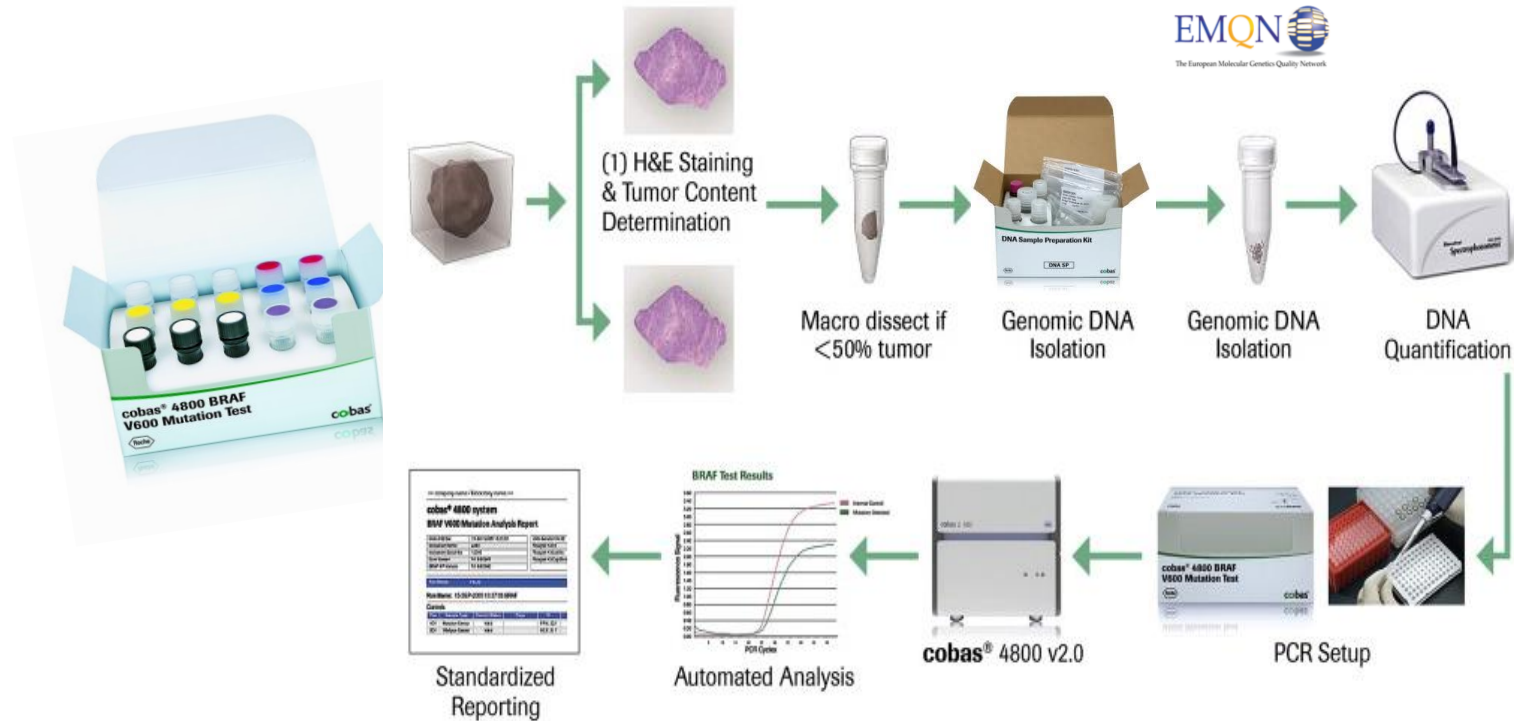


Cáncer de pulmón



<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Mutaciones <i>EGFR</i>	Diana terapéutica	Tumor	Q-PCR y Secuenciación Sanger
Reordenamiento <i>ALK</i>	Diana terapéutica	Corte histológico	FISH

Análisis de *BRAF* mediante la plataforma Cobas y secuenciación Sanger



Sarcomas

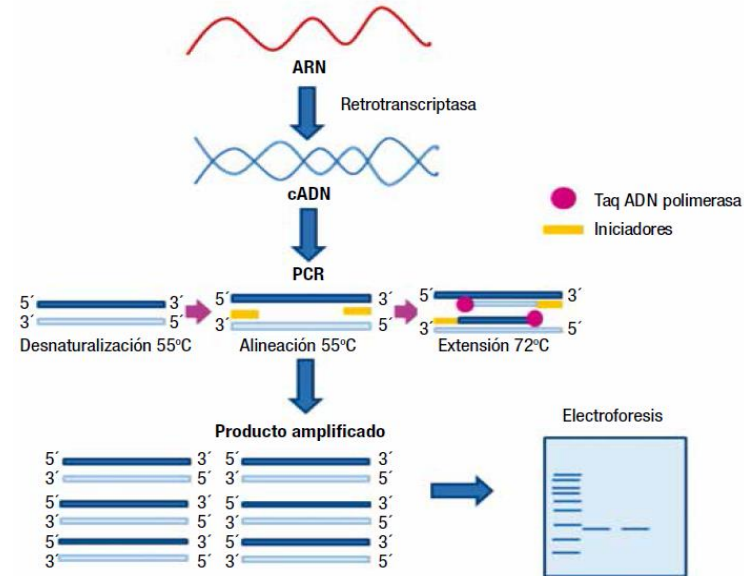
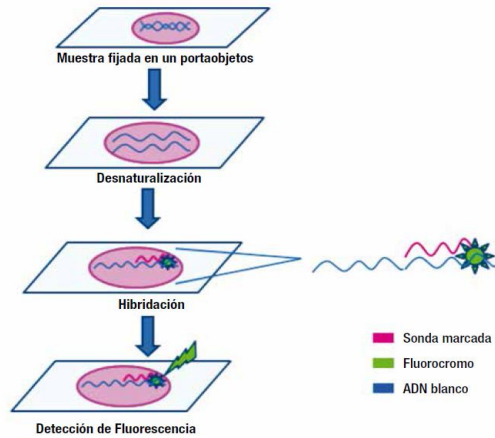
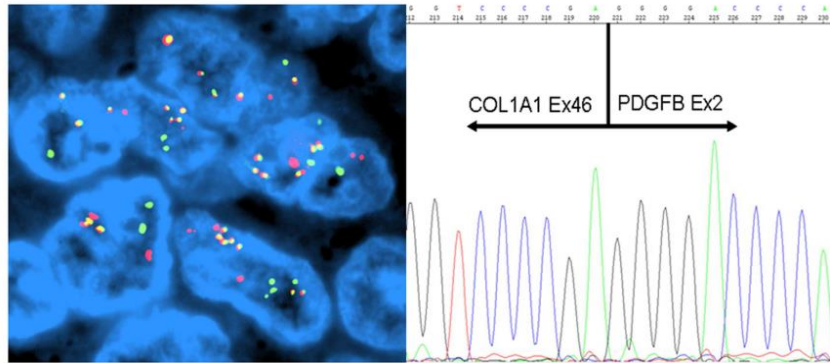


<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Reordenamiento <i>c-MYC</i>	Diagnóstico	Corte histológico	FISH
Reordenamiento <i>EWING</i>	Diagnóstico	Corte histológico	FISH

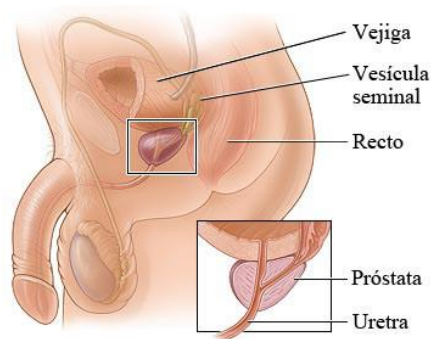
Dermatofibrosarcoma *protuberans*

<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
<i>COL1A1/PDGFb</i>	Diagnóstico	Tumor y corte histológico	RT-PCR y FISH

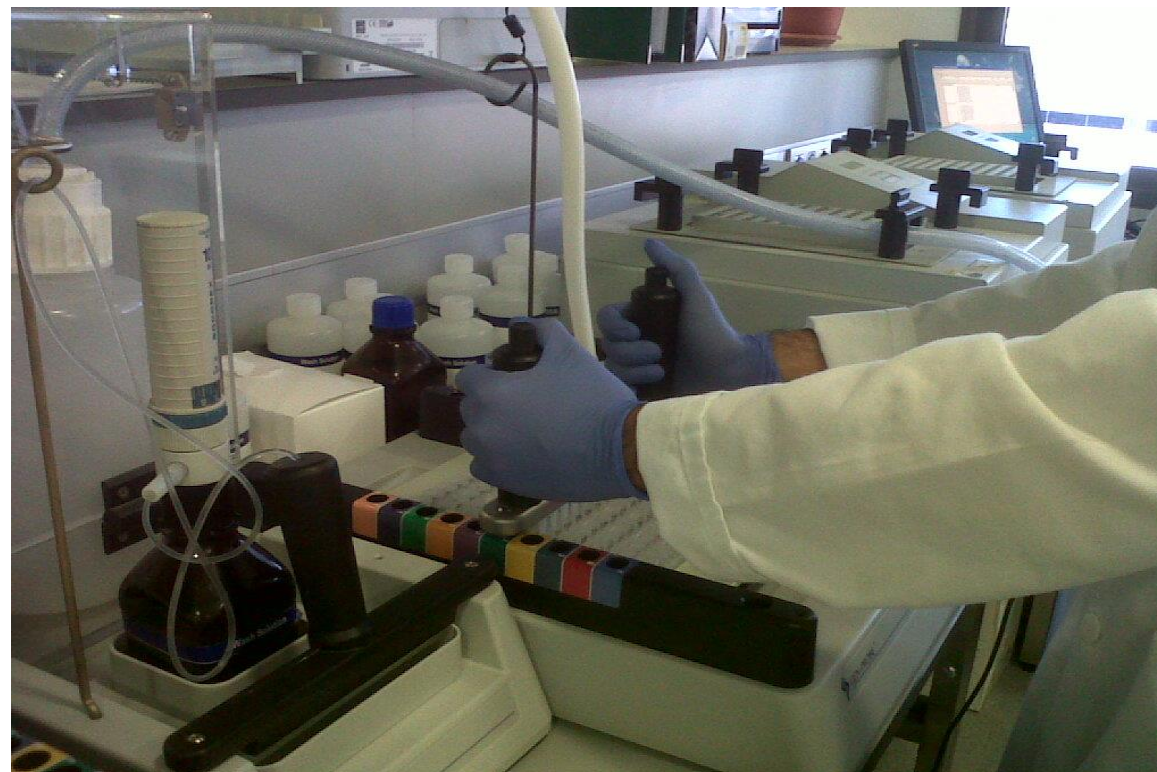
FISH y RT-PCR seguida de secuenciación



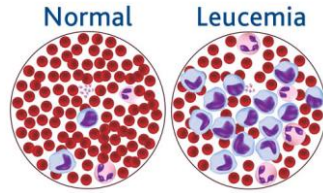
Cáncer de próstata



<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
<i>PCA3</i>	Diagnóstico	Orina	Amplificación mediada por transcripción

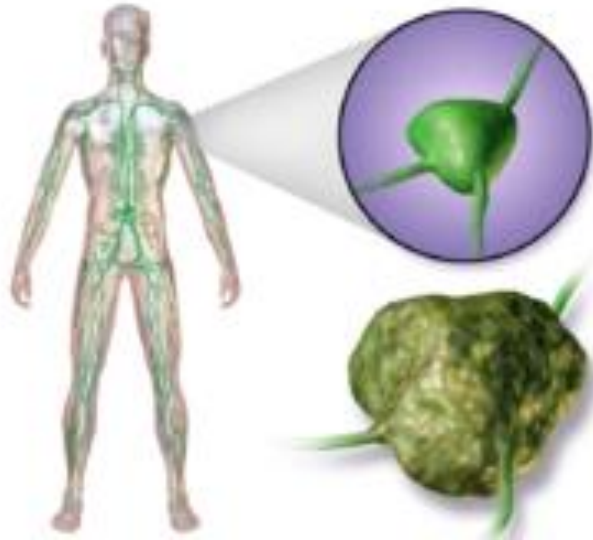


Leucemia Mieloide Crónica



<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
<i>BCR/ABL</i>	Diagnóstico Diana terapéutica Pronóstico	Sangre	Q-RT-PCR

Linfomas



<i>Alteración molecular</i>	<i>Utilidad Clínica</i>	<i>Muestra de partida</i>	<i>Técnica</i>
Reordenamientos IGH	Diagnóstico	Tumor/Sangre	Análisis de fragmentos
Reordenamientos TCR	Diagnóstico	Tumor/Sangre	Análisis de fragmentos
Bcl2 t(14;18)	Diagnóstico	Tumor/Sangre	Amplificación
Bcl1 t(11;14)	Diagnóstico	Tumor/Sangre	Amplificación

Programas de control de calidad



The European Molecular Genetics Quality Network

The logo for SEAP-IAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica y División Española de International Academy of Pathology) features a green checkmark inside a red circle with the text 'SEAP-IAP CALIDAD GARANTIZADA' around it.

**GARANTÍA DE CALIDAD EN PATOLOGÍA DE LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
Y DIVISIÓN ESPAÑOLA DE
INTERNATIONAL ACADEMY OF PATHOLOGY**

➤ más información

*BRCA1/BRCA2
EGFR, KRAS, BRAF*
Once a year

EGFR, KRAS, BRAF
Twice a year

The accreditation certificate from ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) is for HEALTH IN CODE, S.L. It is for the analysis of BRCA1/BRCA2, EGFR, KRAS, and BRAF, performed once a year. The certificate is issued under the UNE-EN ISO 15189 standard. The accreditation number is 1211/LE2335. The certificate is valid from 29/07/2016. The certificate is signed by D. José Manuel Prieto Barrio, ENAC President. The certificate is valid until notification to the contrary. The certificate is valid without its corresponding technical annex, which number coincides with the accreditation. The present accreditation and its technical annex could be reduced, temporarily suspended and withdrawn. The state of validity of it can be confirmed at www.enac.es. The accreditation maintains its validity unless otherwise stated. The present accreditation is not valid without its corresponding technical annex, which number coincides with the accreditation. This accreditation and its technical annex could be reduced, temporarily suspended and withdrawn. The state of validity of it can be confirmed at www.enac.es. ENAC is signatory of the European Recognition Agreement signed among National Accreditation Bodies (www.european-accreditation.org). ENAC is signatory of the European Recognition Agreement signed among National Accreditation Bodies (www.european-accreditation.org). Ref.: CLC/1672 Fecha de emisión 29/07/2016. Código Validación Electrónica: 0865780468947034. La vigencia de la acreditación y del presente certificado puede confirmarse en <http://www.enac.es/web/enac/validacion/electronica> o haciendo clic aquí.



TRAIL
solidari
Ciutat d'Alcoi