

Reunión de Primavera

**SeAP-IAP**

[Sociedad Española de Anatomía Patológica]  
[International Academy of Pathology]



SaludMadrid

Hospital Universitario  
**12 de Octubre**

**i+12**

Instituto de Investigación  
Hospital 12 de Octubre



# Consideraciones Pre-Analíticas para el desarrollo de NGS

Yolanda Ruano Domínguez  
Anatomía Patológica

# Fases NGS



## PRE-ANALÍTICA

- Tipo de muestra (calidad y cantidad)
- Tipo de análisis
- Plataforma de NGS

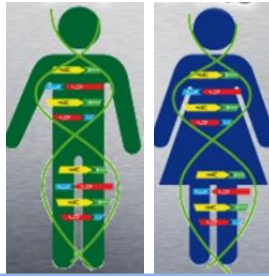
## ANALÍTICA

- Preparación de la muestra
- Generación de librerías
- Secuenciación

## POST-ANALÍTICA

- Análisis bioinformático

# Fase Pre-Analítica



¿Qué tipo de muestra tenemos?

- Tumor sólido
- Citología
- Biopsia líquida

¿Qué queremos secuenciar?

- Genoma
- Exoma
- Transcriptoma
- Panel de genes

¿Qué plataforma elegimos?

- Química de secuenciación
- Volumen de muestras
- Coste por muestra
- Diagnóstico o investigación, etc.

Cantidad  
Calidad



¿Qué tipo de muestra tenemos?



# Tipo de muestra



## TUMOR SÓLIDO

- Fresco
- Congelado
- **Fijado en formol 4% e incluido en parafina (FFPE)**

## CITOLOGÍA

- Extensión citológica
- Bloque celular
- Medio líquido

## BIOPSIA LÍQUIDA

- ADN germinal (Sangre total)
  - cfDNA/cfRNA
  - CTCs
  - Exosomas
- } Plasma  
} Suero  
} Orina...

# Tumor Sólido



TAMAÑO y LOCALIZACIÓN



CANTIDAD  
de ácidos  
nucleicos

-**Resección quirúrgica:** Tamaño tumoral grande y alta celularidad.  
**Abundante ADN/ARN.** Compatible con la mayoría de procedimientos de NGS

-Biopsia

-**Superficial**

Tamaño y celularidad variable

-**Guiada por imagen**

Tamaño y celularidad pequeña o muy pequeña



**Cantidad de ADN/ARN limitada**

No compatible con todos los procedimientos para NGS



# Tumor Sólido



**CELULARIDAD y VIABILIDAD**



**CALIDAD de  
ácidos  
nucleicos**

- Naturaleza del tumor (sólido, quístico, esclerótico o mucinoso)
- Abundancia de células estromales, inflamatorias, necrosis, apoptosis, etc.
- Presencia de inhibidores (sangre, melanina, mucina, etc)

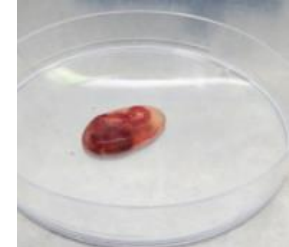


# Tipo de tumor sólido



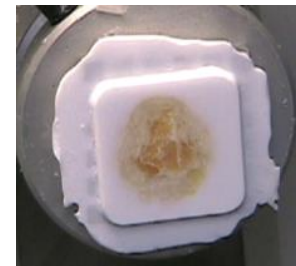
## ➤ Fresco:

- Buena integridad del ADN y ARN
- **Presencia y fracción tumoral difícilmente evaluable**



## ➤ Congelado (-80°C):

- Buena integridad del ADN y ARN
- Confirmar presencia de tumor (H&E)
- **Fracción tumoral difícilmente evaluable**

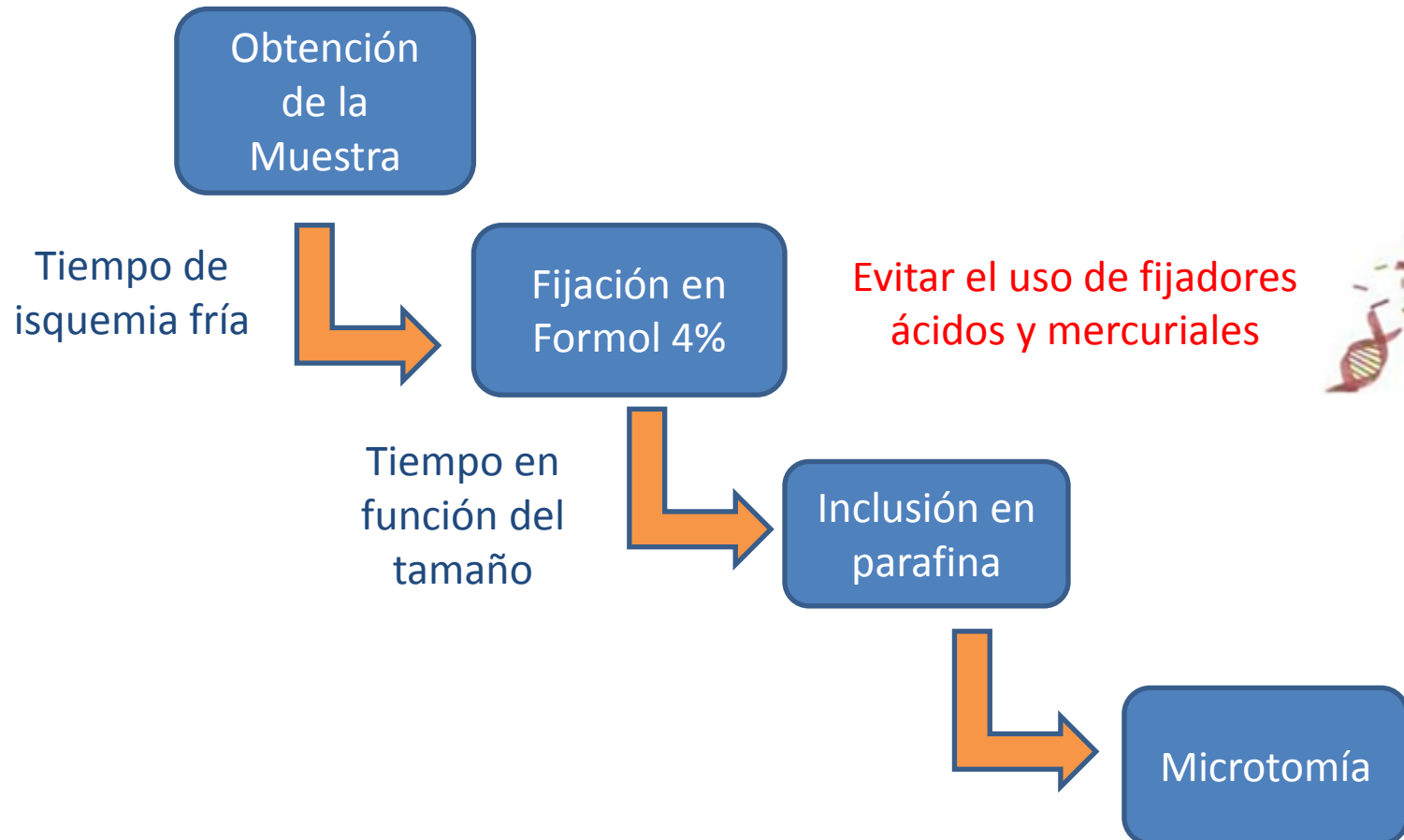




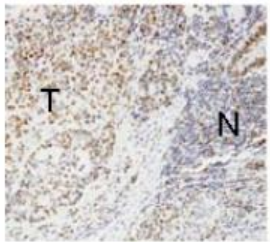
# Tipo de tumor sólido



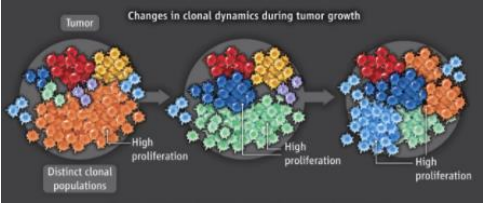
## ➤ FFPE



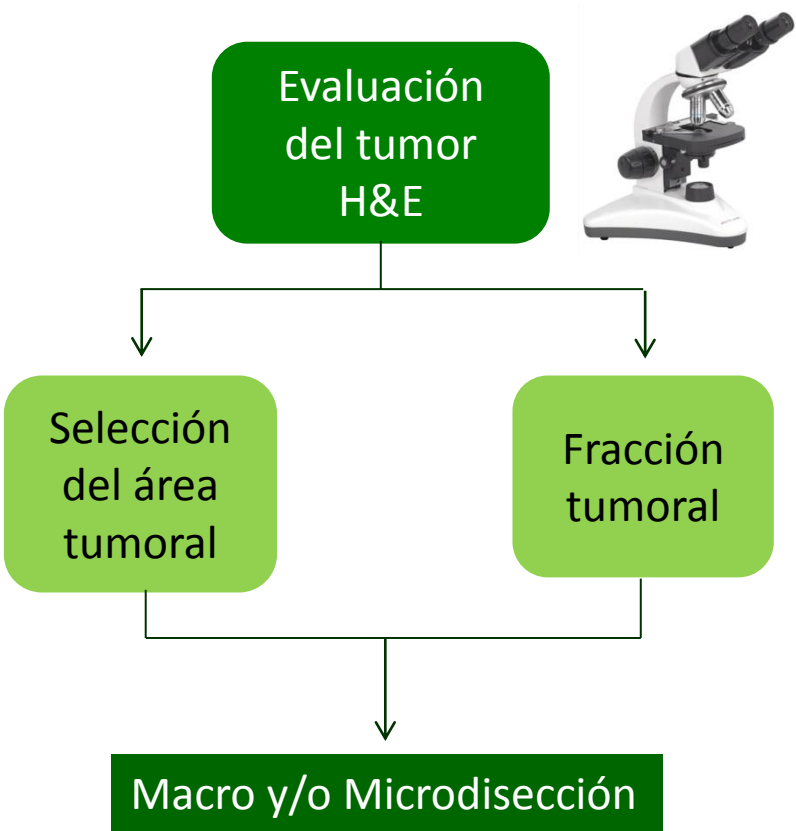
# Revisión histológica muestras FFPE



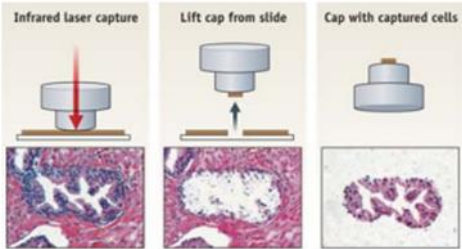
**Infiltración tejido no tumoral**



**Heterogeneidad clonal intratumoral**



**Sensibilidad NGS**  
(mínimo 20-30% células tumorales)



# Muestras FFPE



Las biopsias (FFPE) se consideran el estándar para las pruebas moleculares

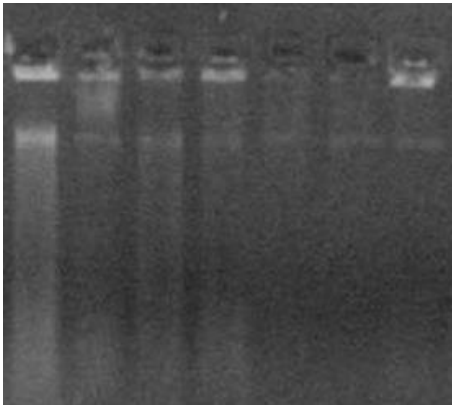


Sin embargo, en la práctica tiene algunas **limitaciones**

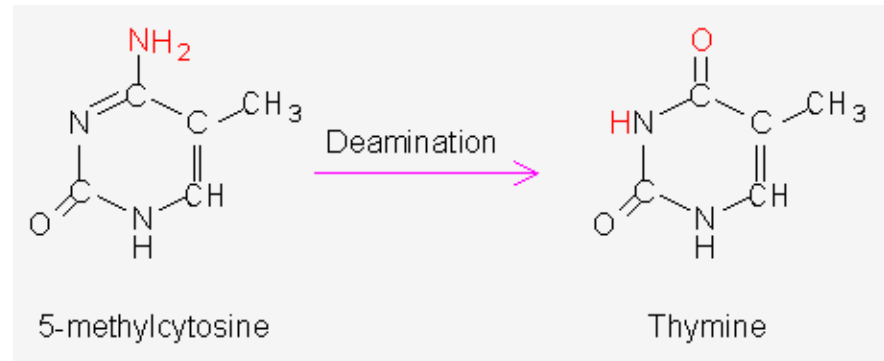
# Limitaciones de muestras FFPE



- ADN fragmentado (~100-150 pb)



- Deaminación de Citosinas (C:G>T:A)



Tratamiento con Uracil-DNA glicosilasa



- Evaluación más rápida del tumor
- Integridad ácidos nucleicos conservada (fijadores alcohólicos)
- Enriquecido en células tumorales
- Citología de hueso no decalcificada
- Tipo de citologías:
  - Extensiones citológicas
  - Citospin
  - Bloques celulares (fijados en formol)
  - Citologías en medio líquido

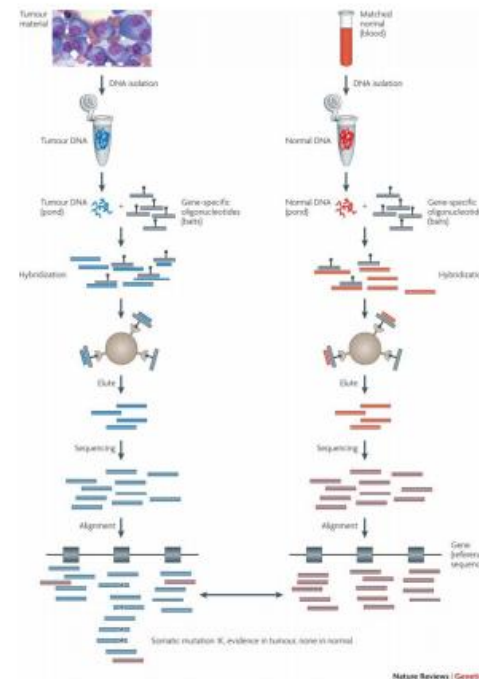
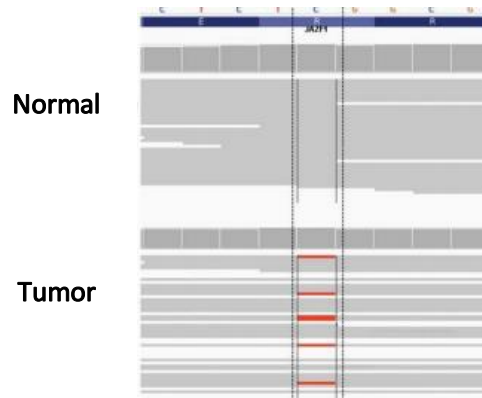
# Biopsia Líquida



## ➤ Sangre total (ADN genómico):

-Estudios de línea germinal

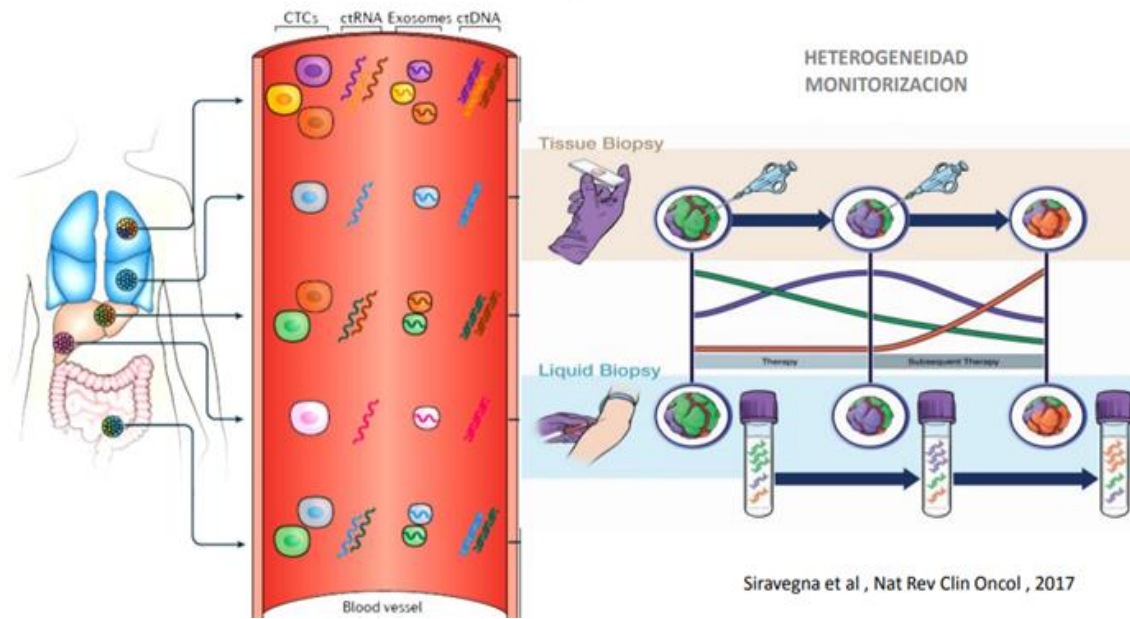
-Tumores (filtro de variantes) Se duplica el gasto.



# Biopsia Líquida



➤ Plasma, Orina, Suero, etc

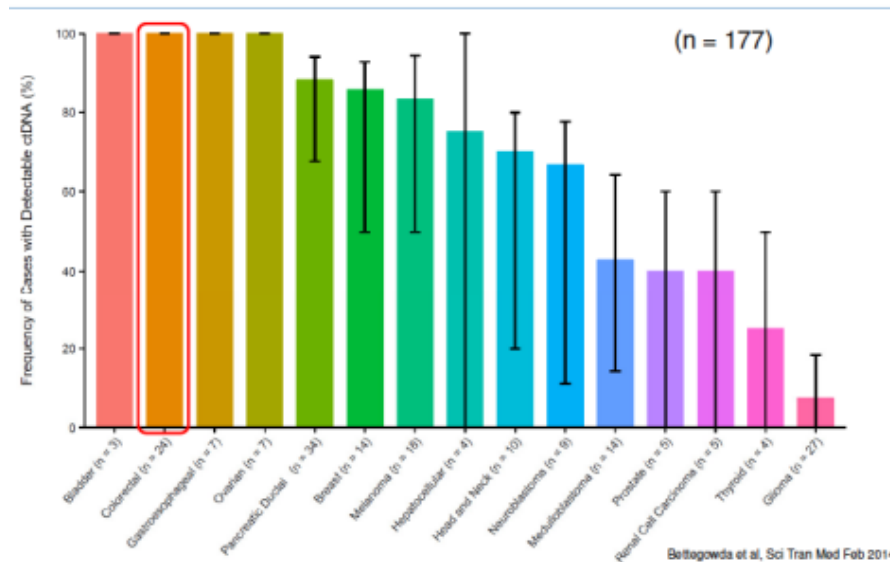


# Limitaciones Biopsia Líquida



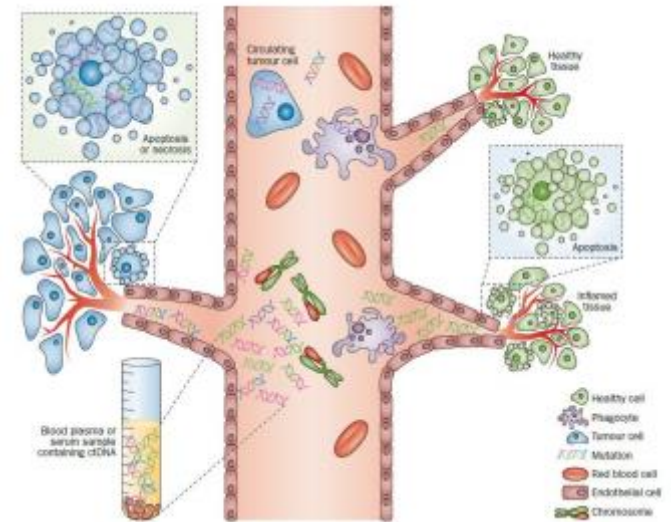
La cantidad de CTCs, ctDNA, ctRNA, etc puede variar dependiendo de:

- Tipo de tumor
- Estadio del tumor(localizado, diseminado)
- Carga tumoral



Bettgowda et al, Sci Tran Med Feb 2014

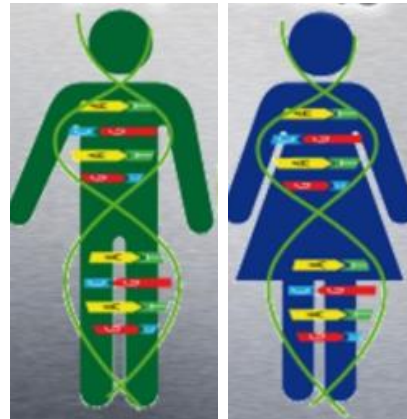
## DNA no tumoral circulante



- Altas cantidades de muestra
- Secuenciar con una alta profundidad (Ejemplo: 40.000X)



# ¿Qué queremos secuenciar?



# Aplicaciones NGS más comunes



## Genoma

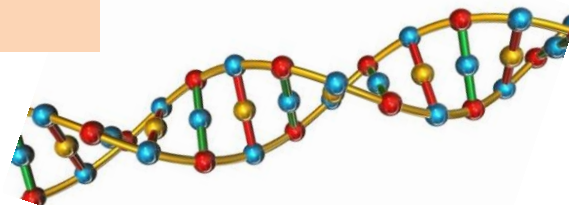
- Secuenciación de novo
- Mutaciones
- CNVs
- INDELS

## Exoma

- Mutaciones
- CNVs
- INDELS

## RNA-seq Transcriptoma

- mRNA
- Splicing alternativo
- miRNA



## Paneles

- Secuenciación dirigida

Metagenómica  
Metatranscriptómica

## ChIP-seq Epigenómica

- Interacción proteína-DNA
- Metilación de histonas
- Zonas de unión factores transcripción

# Genoma y Exoma



No hay correlación clara entre un fenotipo y una enfermedad



- Variantes conocidas asociadas a una determinada enfermedad
- Nuevas variantes asociadas con el fenotipo de la enfermedad



## GENOMA

- Regiones codificantes y no codificantes
- Alta complejidad de datos



## EXOMA/TRANSCRIPTOMA

- Regiones codificantes y de splicing
- Moderada complejidad de datos

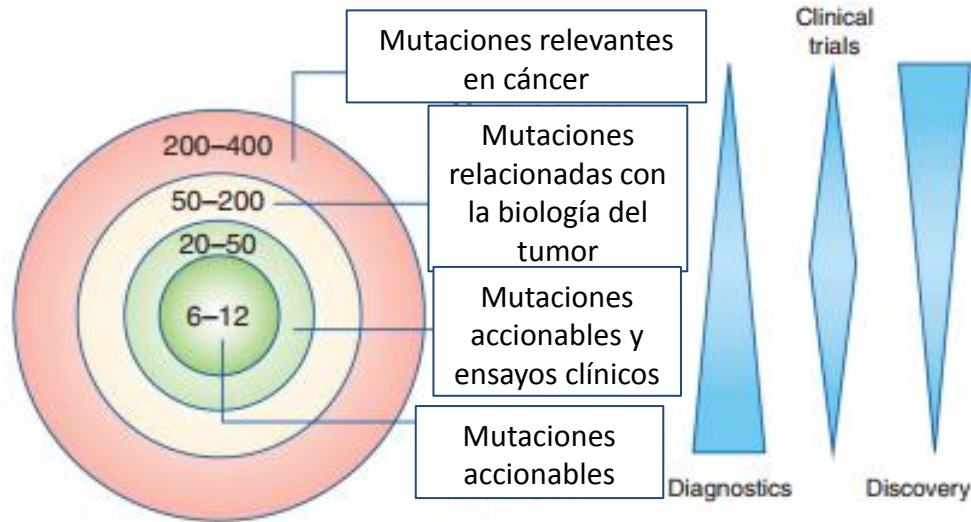


**Hallazgos incidentales**

# Paneles de genes

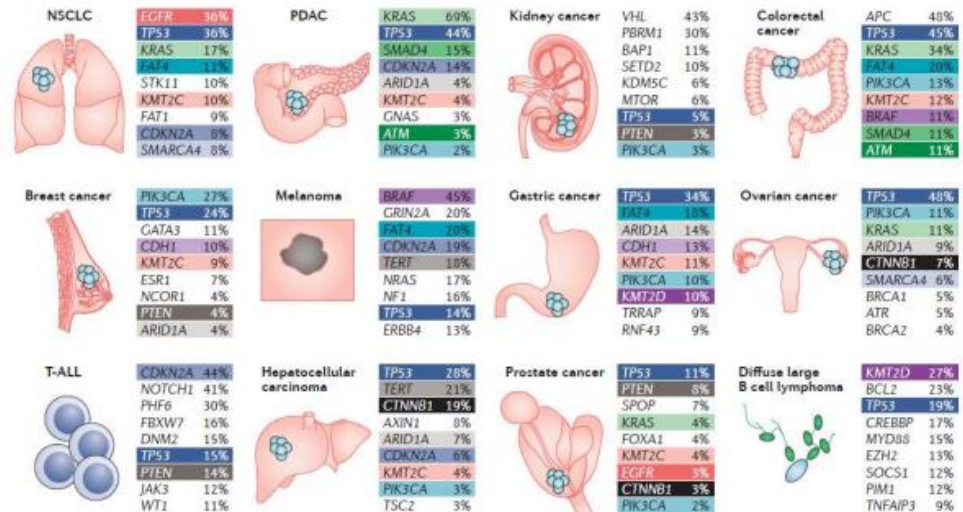


Se conoce la enfermedad...



-Baja complejidad de datos  
-Menos hallazgos incidentales

Paneles comerciales  
O  
Paneles a la carta

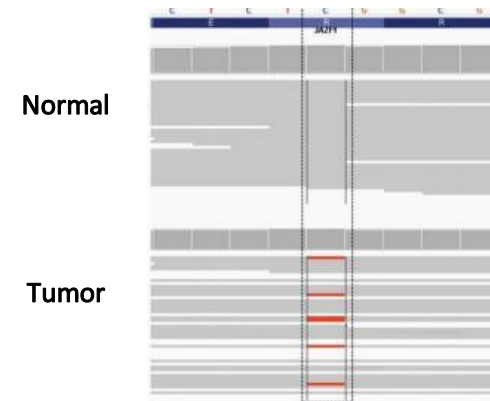


# Limitaciones



## Genoma, Exoma, Transcriptoma

- Preferiblemente tejido congelado
- Filtrado de variantes con tejido normal del paciente (congelado o sangre)
- Enriquecimiento con sondas de captura



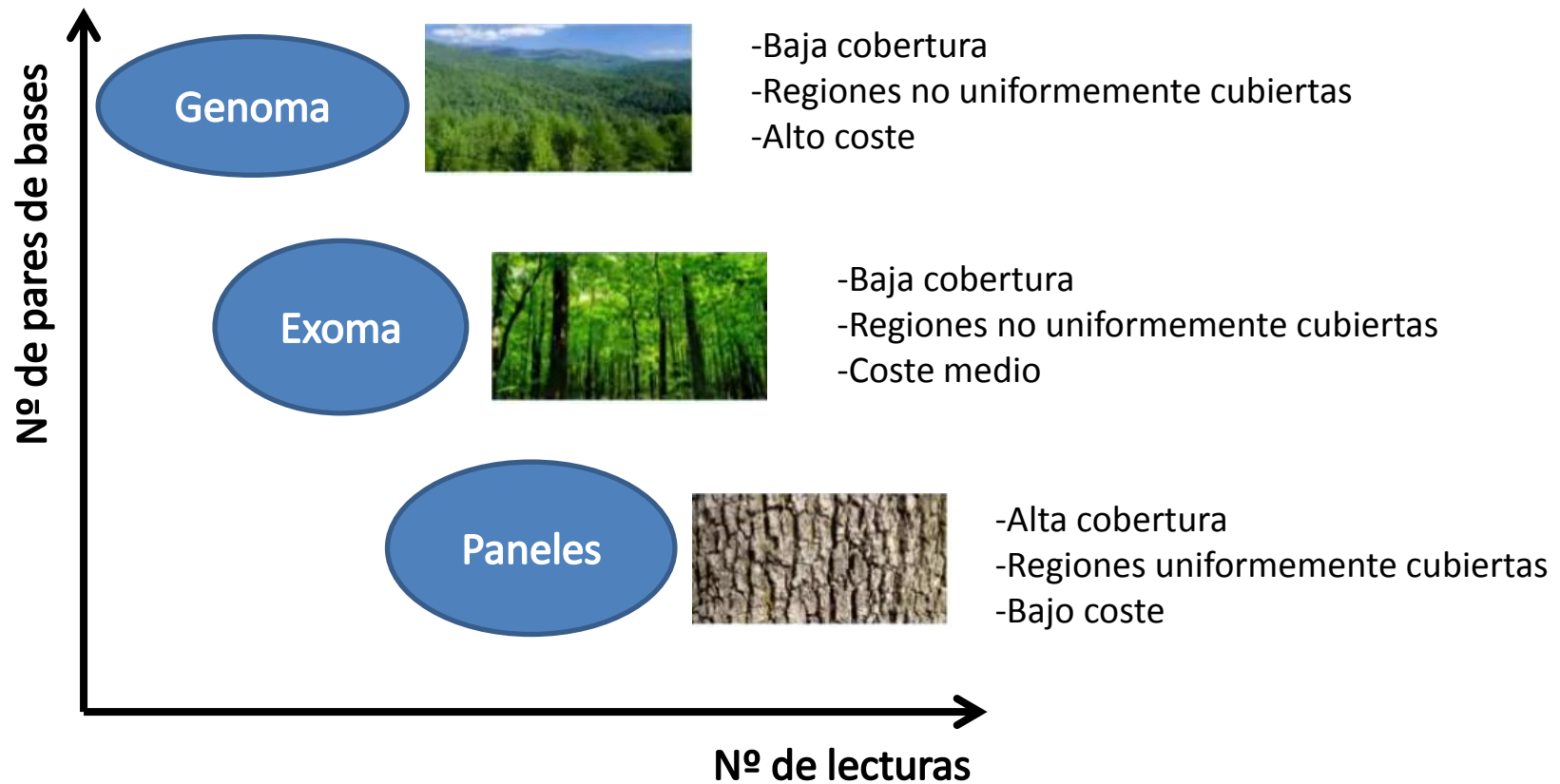
## Paneles de genes

- Todo tipo de muestras
- No es necesario tejido normal
- Enriquecimiento con amplicones

# Cobertura en NGS



Nº de veces que es leída o secuenciada una base o nucleótido en una muestra y cuyas lecturas alinean con el genoma de referencia.



# Cobertura en NGS



Baja Resolución  
y Sensibilidad



**Cobertura**

Alta Resolución  
y Sensibilidad



**Detección de mutaciones  
en baja frecuencia**



**Cálculo de la cobertura en función de:**

- Nº de amplicones o regiones a estudiar
- Nº de lecturas chip o cartucho de secuenciación
- Nº de muestras por carrera

**Coberturas mínimas:**

- Germinal 100X
- Somático 500X



**¿Qué plataforma elegimos?**

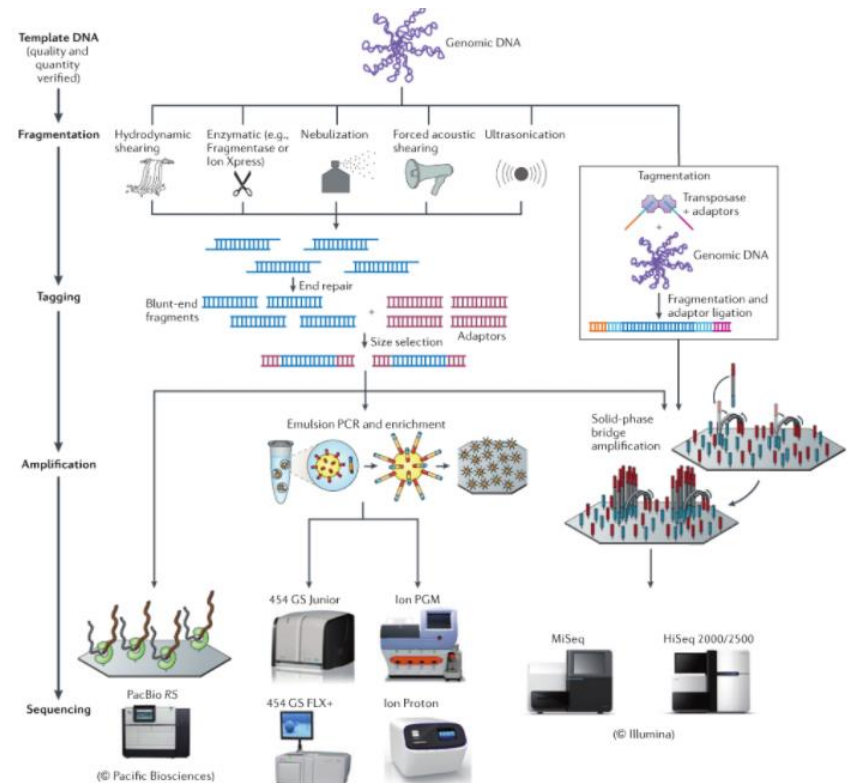




# Diferencias entre plataformas de NGS



- Capacidad de secuenciación
- Longitud de la secuencia
- Tiempo de carrera
- Calidad y fiabilidad de los resultados
- Coste por muestra



# Elección de la plataforma de NGS



- Investigación o diagnóstico
- Tamaño de la región a secuenciar
- Secuenciación uni o bidireccional
- Amplicones o sondas de captura
- Workflow de análisis
- Marcado CE-IVD
- Automatización del proceso, .....



## Muestras:

- Volumen de muestras
- Nº de muestras por carrera:
  - Cobertura
  - Tiempo de respuesta
  - Coste por muestra

## En resumen...



- La **fase pre-analítica** en NGS es **crítica** para obtener **resultados de calidad**.
- Las **muestras FFPE** son las más utilizadas para NGS pero con limitaciones: **ADN fragmentado y deaminaciones**.
- La **cobertura** es un indicador de resolución y sensibilidad de la NGS.
- El **número de muestras por carrera** va a depender de la **cobertura** necesaria, en función del tipo de muestra y tipo de análisis.
- El estudio de **biopsia líquida** por NGS requiere de **altas cantidades de muestra y muy alta cobertura**.
- Los **paneles de genes** son los que tienen **mejor resolución y sensibilidad** frente a otras aplicaciones frecuentes como genoma, exoma o transcriptoma.

Muchas gracias

