



**CATÁLOGO DE SERVICIOS
PRUEBAS DE APOYO AL DIAGNÓSTICO**

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS

**Melchor Fernández Almagro, 3, 28929 MADRID
Tlf. +34 912246900; www.cnio.es**

PROGRAMA DE GENÉTICA DEL CÁNCER HUMANO

CATÁLOGO DE SERVICIOS (Manual de muestras primarias)

Elaborado por:
Mercedes Robledo / Jefe de Unidad Cáncer Endocrino
Miguel Urioste / Jefe de Unidad Clínica de Cáncer Familiar
Fecha: Febrero 2013

Revisado /Aprobado por:
Javier Benítez / Dtr. Programa Genética del Cáncer Humano
Fecha: Febrero 2013

ÍNDICE

Identificación mutaciones en gen AIP	Identificación mutaciones en gen PTEN
Identificación mutaciones en gen APC	Identificación mutaciones en gen PRKAR1A
Identificación mutaciones en gen BRCA1	Identificación mutaciones en gen RET(MEN 2)
Identificación mutaciones en gen BRCA2	Identificación mutaciones en gen RET (estudio completo)
Identificación mutaciones en gen CDH1	Identificación mutaciones en gen SDHAF2
Identificación mutaciones en gen CDKN2A (p16)	Identificación mutaciones en gen TMEM127
Identificación V600E en gen BRAF	Identificación mutaciones en gen SDHA
Identificación mutaciones en gen FH	Identificación mutaciones en gen SDHB
Identificación mutaciones en gen FLCN	Identificación mutaciones en gen SDHC
Identificación mutaciones en gen HRPT2	Identificación mutaciones en gen SDHD
Identificación mutaciones en gen HIF2 α	Identificación mutaciones en gen MET
Identificación mutaciones en gen MAX	Identificación mutaciones en gen SH2D1A
Identificación mutaciones en gen MEN1	Identificación mutaciones en gen STK11
Identificación mutaciones en gen MSH2	Identificación mutaciones en gen VHL
Identificación mutaciones en gen MLH1	Identificación mutaciones en gen PTCH1
Identificación mutaciones en gen MSH6	Grandes reordenamientos de MSH2 y MLH1
Inestabilidad de microsatélites*	Grandes reordenamientos de MSH6 y PMS2
Identificación mutaciones recurrentes en gen MUTYH	Grandes reordenamientos de BRCA1 y BRCA2
Identificación mutaciones en gen MUTYH (estudio completo)	Estudio de haplotipos (previo acuerdo con el <i>Programa de Genética Humana</i>)
Identificación mutaciones en gen TP53	

Identificación de mutaciones en el gen AIP(OMIM#605555)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Adenoma Hipofisario Familiar (OMIM # 600634)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen APC (OMIM#611731)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Adenomatosa Familiar (OMIM#611731), síndrome de Gardner (OMIM#611731), o síndrome de Turcot (OMIM#276300)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen BRCA1 (OMIM#113705)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (OMIM#604370)	Secuenciación masiva	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen BRCA2 (OMIM#600185)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (OMIM#604370).	Secuenciación masiva	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen CDH1 (OMIM#192090)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de cáncer gástrico difuso familiar (OMIM#137215).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

Identificación de mutaciones en el gen CDKN2A (p16) (OMIM#600160)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de melanoma familiar	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de la mutación V600E en el gen BRAF (OMIM#164757)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Forma esporádica de cáncer de colon con inestabilidad de microsátélites	Secuenciación directa	Tumor parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales <u>Secciones</u> – 5 <u>secciones de 5 μm de espesor</u> <u>clu</u>	30 días

Identificación de mutaciones en el gen FH (OMIM#136850)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Leiomiomatosis y Cáncer Renal familiar (OMIM#605839).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen FLCN (OMIM#607273)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha del síndrome de Birt-Hogg-Dubè (OMIM#135150).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen HIF2α (OMIM#603349)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de feocromocitoma familiar	Secuenciación directa	Tumor parafinado	<u>Bloques</u> 60% células tumorales	30 días

Identificación de mutaciones en el gen HRPT2 (OMIM#607393)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Carcinoma Paratiroideo familiar o Hiperparatiroidismo primario familiar (OMIM#145001).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

Identificación de mutaciones en el gen MAX (OMIM#171300)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de feocromocitoma familiar	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen MEN1 (OMIM#131100)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo I (OMIM#131100).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen MSH2 (OMIM#609309)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

Identificación de mutaciones en el gen MLH1 (OMIM#120436)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

Identificación de mutaciones en el gen MSH6 (OMIM#600678)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	60 días (secuenciación)

Inestabilidad de microsatélites*

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC).	Análisis de fragmentos. (*)Es aconsejable acompañar esta prueba de el análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas del sistema de reparación de ADN (MLH1, MSH2, y MSH6)	Tumor parafinado	<u>Bloques</u> 60% de células tumorales <u>Secciones</u> – 5 secciones de 5 µm de espesor c/u	30 días (inestabilidad de microsatélites más análisis inmunohistoquímico)

Identificación de mutaciones en el gen MUTYH (estudio completo) (OMIM#604933)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Atenuada Asociada a MYH o de herencia autosómica recesiva (OMIM#608456)	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones recurrentes en el gen MUTYH (OMIM#604933)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Poliposis Atenuada Asociada a MYH o de herencia autosómica recesiva (OMIM#608456)	Secuenciación directa de mutaciones recurrentes	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen TP53 (OMIM#191170)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Li-Fraumeni (OMIM#151623).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLP)

Identificación de mutaciones en el gen PTCH1 (OMIM#109400)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Gorlin	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

Identificación de mutaciones en el gen PTEN (OMIM#601728)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de síndrome de Cowden (OMIM#158350), de síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (OMIM#153480), de síndrome de Proteus (OMIM#176920), de Proteus-like, o de síndrome de Macrocefalia y Autismo (OMIM#605309).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen PRKAR1A (OMIM#188830)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de complejo de Carney (OMIM#160980)	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen RET (estudio completo) (OMIM#164761)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (OMIM#171400).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen RET (exones 8, 10, 11, 13-16) (OMIM#164761)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (OMIM#171400).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen SDHA (OMIM#600857)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	60 días

Identificación de mutaciones en el gen SDHB (OMIM#185470)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen SDHC (OMIM#602413)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen SDHD (OMIM#602690)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen SDHAF2 (OMIM*613019)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen TMEM127

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de Feocromocitoma y/o Paraganglioma familiar (OMIM#168000).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen MET (OMIM#164860)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha clínica de Cáncer Renal Papilar familiar (OMIM#605074)	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen SH2D1A (OMIM#300490)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de enfermedad de Duncan o trastorno linfoproliferativo ligado al cromosoma X (OMIM#308240).	Secuenciación directa	Sangre periférica	10 ml	30 días

Identificación de mutaciones en el gen STK11 (OMIM#602216)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Peutz-Jeghers (OMIM#175200).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Identificación de mutaciones en el gen VHL (OMIM#608537)

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Von Hippel-Lindau (OMIM#168000).	Secuenciación directa y MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (secuenciación) y 30 días (MLPA)

Grandes reordenamientos de MSH2/MLH1

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (MLPA)

Grandes reordenamientos de MSH6/PMS2

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) (OMIM#120435).	MLPA	Sangre periférica	10 ml	30 días (MLPA)

Grandes reordenamientos en BRCA1y BRCA2

Indicación	Descripción	Tipo de muestra	Cantidad	t respuesta
Sospecha de cáncer de mama y ovario familiar (OMIM#604370)	CGH array	Sangre periférica	10 ml	30 días

(*) Las cantidades indicadas son cantidades óptimas.

- En sangre periférica para pacientes en tratamiento cuyo número de células sea bajo y para estudios de enfermedad residual se requieren como cantidad óptima 10 ml
- Para estudios de inestabilidad de microsatélites (MSI) además de tejido tumoral se requieren 3 ml de sangre periférica o tejido normal del mismo pacient

Descripción de las técnicas empleadas**Secuenciación**

La secuenciación consiste en una lectura automática de nucleótidos contenidos en un fragmento de ADN amplificado por PCR. La interpretación del cromatograma de secuenciación del ADN de interés se realiza con ayuda de un programa informático adecuado y su traducción en la secuencia nucleotídica respectiva.

DHPLC (*Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*).

Esta técnica permite identificar cambios en la secuencia de ADN (cambios puntuales, inserciones o deleciones), debido a que los heteroduplex y los homoduplex son retenidos de forma distinta en la columna hidrofóbica del sistema, y liberados a tiempos distintos en una concentración creciente de acetonitrilo. Los fragmentos de ADN pasan a través de un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, de manera que el software lo representa en forma de picos.

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Esta técnica permite la cuantificación de copias de un gen de interés mediante una hibridación de sondas específicas, un paso de ligación, una amplificación con primers marcados, una separación de acuerdo al tamaño de los fragmentos amplificados, y una normalización relativa a fragmentos control, representativos de otras partes del genoma diferentes al gen en estudio.

Aclaraciones sobre la muestra necesaria para hacer los estudios y documentación requerida.

1. Los análisis se llevan a cabo a partir de una muestra biológica perteneciente a un paciente afectado de la enfermedad en estudio, y no de un individuo sano. Una vez detectada la alteración molecular responsable de la enfermedad de la familia, se podrá ofrecer un estudio genético a cada uno de los miembros relacionados que quieran conocer su condición (sano o portador).
2. El estudio molecular no se comenzará hasta no tener una fotocopia del consentimiento firmado por el paciente, o en su defecto una confirmación por escrito indicando que el centro de origen es poseedor de tal consentimiento.
3. La muestra debe venir acompañada por un resumen de los datos clínicos del individuo candidato a estudio incluyendo árbol genealógico.
4. La muestra debe venir acompañada por la autorización pertinente del Centro de origen.
5. Las muestras se pueden enviar de lunes a viernes. Nuestro horario de recepción de muestras es de 8.00 a 18.00h.
6. Para estudios con RNA es imprescindible que la muestra llegue refrigerada y en el día.
7. Para estudios con DNA se necesitan 10-15 cc de sangre periférica con EDTA, y deberán recibirse en el laboratorio en las 24 horas siguientes a la extracción. La muestra de sangre debe venir bien a temperatura ambiente o bien refrigerada, pero NUNCA congelada.
8. En el estudio de inestabilidad de microsatélites, en relación al cáncer de colon no polipósico, se trabaja a partir del tumor donde se realizó el diagnóstico histopatológico.

Especificaciones técnicas del estudio:

1. Las variantes de significado desconocido (VSD) necesitan de estudios adicionales para poder asignarles un carácter patogénico y por tanto asociado a la enfermedad de un individuo, o bien un carácter polimórfico y por tanto sin relación con la enfermedad. Cuando detectemos una VSD, se contactará con la persona que ha enviado la muestra para analizar si es factible ampliar el estudio. Nuestra estrategia incluye estudio del tumor, o análisis de segregación en la familia, estudio de la variante en una población control entre otros. Dichos estudios no suponen un coste adicional para el centro de origen.
2. Una parte importante de los genes de susceptibilidad mayor al cáncer pueden estar afectados por grandes deleciones, detectadas por MLPA. La proporción de individuos portadores de este tipo de alteración es muy variable según los genes considerados. Cuando un gen se ve afectado por grandes deleciones en una proporción muy baja, su análisis no está contemplado de forma rutinaria en el *screening* que aplicamos. Si el Centro de origen quiere que se analicen las grandes deleciones en estos genes en particular, debe solicitar específicamente este estudio, con un coste adicional de 150 euros.

Especificaciones sobre los tiempos de respuesta:

1. El tiempo de respuesta se contabiliza en todos los casos desde el momento en el que tenemos resumen de la historia clínica, consentimiento firmado por el paciente, o en su defecto declaración del centro de origen de estar en posesión del mismo, y la autorización para realizar el estudio.
2. Para aquellos genes en los que se contempla el estudio rutinario de grandes deleciones, la tabla muestra dos tiempos de respuesta.
 - a) El primero corresponde al estudio por DHPLC y/o secuenciación, que permite analizar la mayor parte de las alteraciones que afectan a estos genes (mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones, o cambios que afectan al proceso de splicing).
 - b) El segundo corresponde al estudio de grandes deleciones, que en todos los casos se realiza una vez que se ha terminado el estudio anterior