



## ORIGINAL

# Aplicación de la secuenciación masiva de nueva generación al diagnóstico molecular de la hipercolesterolemia familiar



Estefanía Martínez-Barrios<sup>a</sup>, Ana Isabel Martínez-Puchol<sup>b</sup>, Alba Roset<sup>a</sup>, Daniel Zambón<sup>c</sup>, Joan Clària<sup>a,b,d</sup> y Montserrat Bernat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

<sup>b</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques, August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

<sup>c</sup> Unidad de Lípidos, Servicio de Endocrinología, Hospital Clínic, Barcelona, España

<sup>d</sup> Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Facultad de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 19 de noviembre de 2014; aceptado el 3 de febrero de 2015

Disponible en Internet el 6 de marzo de 2015

### PALABRAS CLAVE

Secuenciación de nueva generación;  
Secuenciación Sanger;  
Diagnóstico molecular;  
Hipercolesterolemia familiar

### Resumen

**Introducción:** La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad autosómica dominante que cursa con niveles plasmáticos elevados de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad. La presencia de esta alteración en el metabolismo lipídico se asocia a un aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes que la padecen, siendo de gran importancia la realización de un diagnóstico genético para ofrecer un tratamiento adecuado y disminuir la morbimortalidad. El objetivo de este trabajo es describir la aplicación de la secuenciación de nueva generación al diagnóstico genético de la hipercolesterolemia familiar, en comparación con la secuenciación Sanger, la técnica convencional usada hasta el momento.

**Material y métodos:** Se analizaron 110 muestras de sangre venosa periférica procedente de pacientes que presentaban cuadro clínico de hipercolesterolemia familiar mediante secuenciación de nueva generación, utilizando un panel comercial que permite la identificación de mutaciones en los genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* y *LDLRAP1* (SEQPRO Lipo, Progenika) con la tecnología GS JUNIOR 454 (Roche).

**Resultados:** Aplicando esta tecnología fue posible secuenciar los genes asociados a la hipercolesterolemia familiar descritos hasta el momento en grupos de hasta 20 pacientes simultáneamente. Se detectaron un total de 35 mutaciones en las 110 muestras analizadas, localizándose el 94,29% en el gen *LDLR*. Todas las mutaciones identificadas fueron confirmadas mediante el método de secuenciación Sanger.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [mbernat@clinic.ub.es](mailto:mbernat@clinic.ub.es) (M. Bernat).

**Conclusiones:** La utilización de la secuenciación masiva de nueva generación permite la realización de un diagnóstico genético más rápido y un análisis molecular más eficiente de los genes implicados en la hipercolesterolemia familiar con una fiabilidad similar a la técnica convencional Sanger.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## KEYWORDS

Next generation sequencing;  
Sanger sequencing;  
Molecular diagnostic;  
Familial hypercholesterolemia

## Applicability of next generation sequencing to the molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia

### Abstract

**Introduction:** Familial hypercholesterolemia is an autosomal dominant disorder that causes increased levels of cholesterol associated with low density lipoproteins in plasma. The presence of altered lipid metabolism in these patients increases their level of risk of suffering from a cardiovascular disease. The certainty of having this genetic disorder by making a timely and precise molecular diagnostic is crucial for the appropriate treatment and the reduction of the disease morbidity-mortality. The aim of this work is to describe the applicability of next generation sequencing technology to the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia and compare this novel method with the conventional Sanger sequencing method.

**Material and methods:** A next generation sequencing commercial panel (SEQPRO Lipo, Progenika) was used to analyze 110 peripheral venous blood samples from patients with familial hypercholesterolemia. This enables the assessment of mutations in genes associated with the disease (e.g. *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *LDLRAP1*) with the GS JUNIOR 454 technology (Roche).

**Results:** Application of next generation sequencing enables the sequencing of the genes involved in the familial hypercholesterolemias, described so far, in groups of 20 patients simultaneously. Using this novel technology, a total of 35 mutations were detected in the 110 analysed samples, with 94.29% being located in the *LDLR* gene. Mutations were confirmed by Sanger sequencing.

**Conclusion:** Next generation sequencing enables a quick genetic diagnosis and a more efficient molecular analysis of all genes described so far to be involved in familial hypercholesterolemia, with similar reliability to that of conventional Sanger sequencing.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

La hipercolesterolemia familiar (HF; OMIM#143890) es un trastorno genético de herencia autosómica dominante del metabolismo de las lipoproteínas con una prevalencia en la población general alrededor de 1:500 para heterocigotos y 1:1.000.000 para homocigotos<sup>1</sup>. Este trastorno está caracterizado por un incremento en la concentración plasmática del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), cursando a menudo con el desarrollo de xantomas, aterosclerosis, además de un elevado riesgo de presentar enfermedades coronarias prematuras<sup>2</sup>. Se han descrito más de 1.500 mutaciones responsables de HF en los genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, y *LDLRAP1*, la mayoría de ellas en el gen *LDLR*<sup>3-7</sup>.

El diagnóstico de la HF está basado en una combinación de criterios clínicos, bioquímicos y genéticos<sup>8</sup> que han permitido establecer diferentes índices diagnósticos, siendo los criterios de la red de clínicas de lípidos holandesa los más utilizados en España<sup>9</sup> (tabla 1). Este índice permite otorgar una estratificación a los pacientes con HF en diagnóstico de certeza ( $\geq 8$  puntos), probable (6-7 puntos) y posible (3-5 puntos).

La técnica más utilizada hasta el momento para la búsqueda de mutaciones en el ADN es la secuenciación según el método Sanger<sup>10</sup>. Aunque esta técnica presenta una alta sensibilidad y especificidad, su rendimiento es insuficiente para el cribado de la HF donde es preciso realizar un número muy elevado de secuencias para establecer un diagnóstico genético. Con el desarrollo de la secuenciación de nueva generación («next generation sequencing» [NGS]) el rendimiento de la secuenciación ha aumentado de manera significativa ya que permite secuenciar de forma paralela millones de fragmentos y a un coste mucho menor<sup>11,12</sup>. La NGS permite la detección de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones y variaciones en el número de copias (CNV)<sup>13</sup>. Estas características apuntan a la NGS como una herramienta eficaz para la realización del diagnóstico genético de la HF de forma rápida y económica sin renunciar a una alta especificidad, sensibilidad y precisión<sup>14,15</sup>.

El objetivo de este trabajo es describir la aplicación de la NGS para la búsqueda de mutaciones en pacientes con HF con el fin de evaluar la sensibilidad de la técnica, a la vez que identificar las ventajas e inconvenientes que esta pueda presentar en el flujo de trabajo en el laboratorio, en

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2578032>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2578032>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)