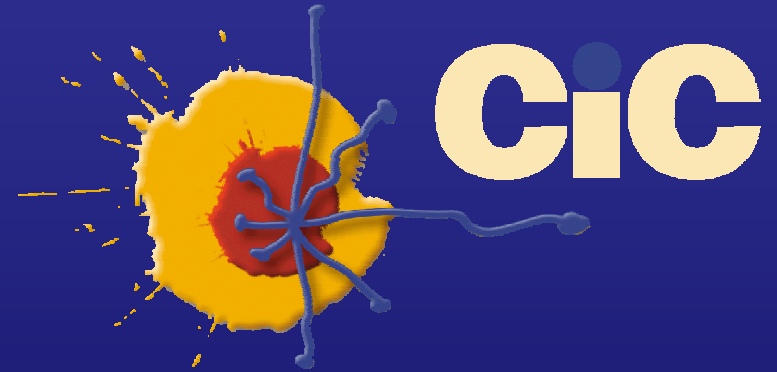


NUEVAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A HEMATOLOGÍA



UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR/HLA. SERVICIO DE HEMATOLOGÍA,
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA,
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CANCER

NUEVAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A HEMATOLOGÍA

Aplicaciones en Hemopatías Malignas

Diagnóstico/Pronóstico: Genes Igs/RCT, Traslocaciones, Expresión de genes..

Enfermedad Residual Mínima: RQ-PCR(Igs/RCT, genes, mutaciones etc..)

Quimerismo Hematopoyético: Microsatélites-STR-, SNPs,

Nuevas Tecnologías: Microarrays

Análisis de Expresión: Transcriptoma: cDNA, oligos, miRNAs....

Análisis Genómicos: CGH-arrays, SNPs

Análisis Epigenéticos: Arrays de Metilación , Chip-on-chip

BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

DIAGNÓSTICO/ PRONÓSTICO

- Reordenamiento de los genes de Igs y RCT:
Linfoproliferaciones reactivas vs clonales
- Traslocaciones cromosómicas:
Específico de algunas hemopatías (útil para el Dx y pronóstico)
- Mutaciones/Polimorfismos:
Diagnóstico: Mutaciones de *JAK-2* (exón 14)....
Inactivación /activación de genes claves: mutación *p53*...
- Expresión genética:
Valor pronóstico : *ZAP-70*, *PRAME*, *p16*...

LEADING ARTICLE

Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936

JJM van Dongen¹, AW Langerak¹, M Brüggemann², PAS Evans³, M Hummel⁴, FL Lavender⁵, E Delabesse⁶, F Davi⁷, E Schuurin^{8,9}, R García-Sanz¹⁰, JHJM van Krieken¹¹, J Droese², D González¹⁰, C Bastard¹², HE White⁵, M Spaargaren¹³, M González¹⁰, A Parreira¹⁴, JL Smith⁵, GJ Morgan³, M Kneba² and EA Macintyre⁶

¹Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; ²II Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; ³Academic Unit of Haematology and Oncology, University of Leeds, Leeds, UK; ⁴Institute of Pathology, Free University Berlin, Berlin, Germany; ⁵Wessex Immunology Service, Molecular Pathology Unit, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton, UK; ⁶Laboratoire d'Hématologie and INSERM EMI 210, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ⁷Department of Hematology, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁸Department of Pathology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ⁹Department of Pathology and Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; ¹⁰Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ¹¹Department of Pathology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; ¹²Laboratoire de Genetique Oncologique, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; ¹³Department of Pathology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; and ¹⁴Department of Hematology, Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Portugal

BIOMED-2 Concerted Action.

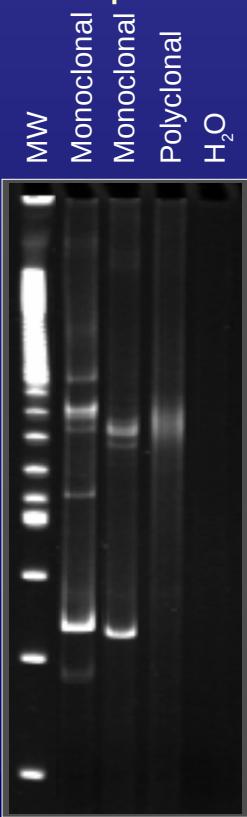


6 VHFR1 primers

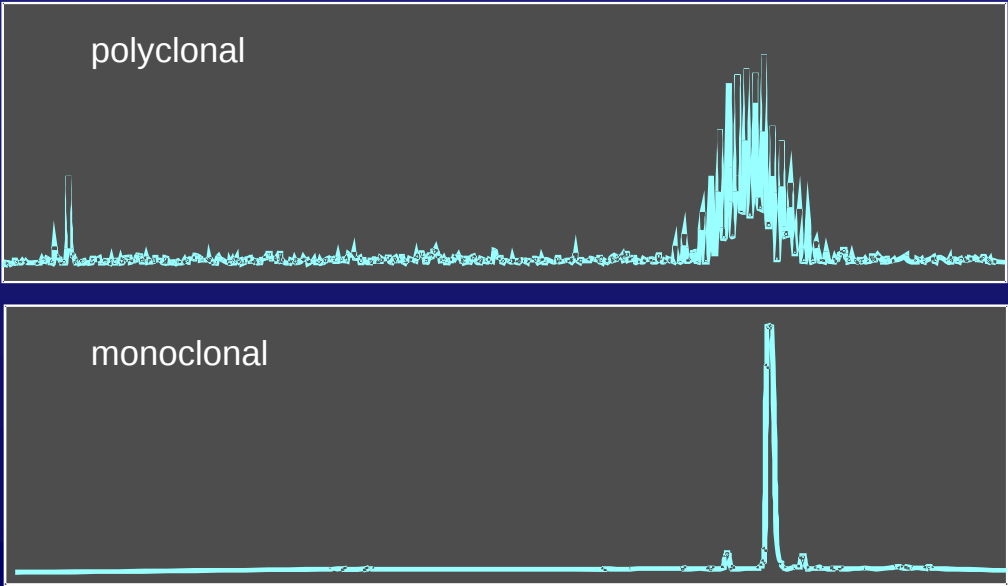
JH primer *

CTGTGCAAGAG CCGGGG CTATGGTTCAGGGAGTTAT CTACTACGGTATGGACGTCTGG
 CTGTGCAAGAG GACGA ACAGTAACCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
 CTGTGCAAGAGA GATAGTATAGCAGCTCGTg ACAACTGGTTCGACTCCTGG
 CTGTGCAAGAGA TCCGGGC AGCTCGTTCTTTTGATATCTGG
 CTGTGCAAGAG CCTCTCTCCACTGGGATGGGGCTACTGG
 CTGTGCAAGAG CAGCAGCTCGGCCCTTTGACTACTGG
 CTGTGCAAGAG GACTTTGATGCTTTTGATATCTGG
 CTGTGCAAGAG gGTGGGAGCTACTGACTACTGG
 CTGTGCAAG gGTAGCTAAAC CTTTGACTACTGG
 CTGTGCAA TGTACTTTGACTACTGG

Heteroduplex analysis



GeneScan analysis



BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

DIAGNÓSTICO/ PRONÓSTICO

- Reordenamiento de los genes de Igs y RCT:
Linfoproliferaciones reactivas vs clonales
- **Traslocaciones cromosómicas:**
Específico de algunas hemopatías (útil para el Dx y pronóstico)
- **Mutaciones/Polimorfismos:**
Diagnóstico: Mutaciones de *JAK-2* (exón 14)....
Inactivación /activación de genes claves: mutación *p53*...
- **Expresión genética:**
Valor pronóstico : *ZAP-70*, *PRAME*, *p16*...

Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease

Leukemia, 1999; 13:1901–28

Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia

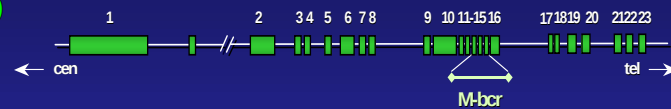
JJM van Dongen¹, EA Macintyre², JA Gabert³, E Delabesse², V Rossi⁴, G Saglio⁵, E Gottardi⁵, A Rambaldi⁶, G Dotti⁶, F Griesinger⁷, A Parreira⁸, P Gameiro⁸, M González Díaz⁹, M Malec¹⁰, AW Langerak¹, JF San Miguel⁹ and A Biondi⁴

Material y métodos

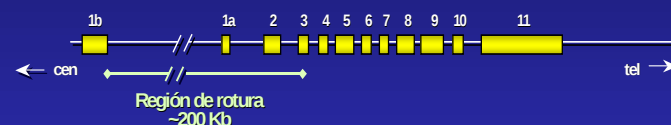
BIOMED-1 Concerted Action

t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL p210

BCR (22q11)



ABL (9q34)



BCR

ABL



BCR-b1-A →

← ABL-a3-B

BCR-b2-C →

← ABL-a3-D

← ABL-a3-E3'

Líneas celulares:

BV173: b2a2 y b3a2
KCL22: b2a2
K562: b3a2
LAMA-84: b3a2

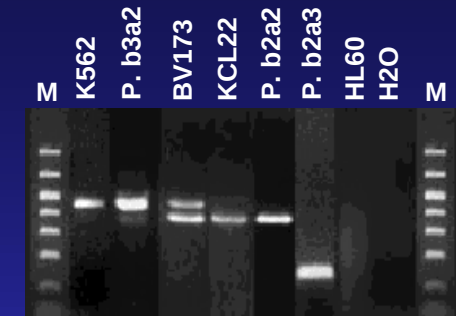
Pacientes:

b3a2
b2a2

Resultados

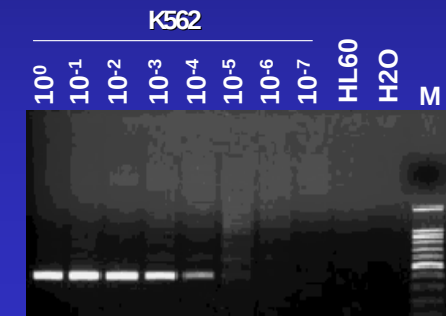
BIOMED-1 Concerted Action

Primer	Secuencia 5'-3'
BCR-b1-A	GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC
ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTC
BCR-b2-C	CAGATGCTGACCAACTCGTGT
ABL-a3-D	TTCCCATTTGTGATTATAGCCTA
ABL-a3-E3'	TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT



Tamaños de los productos de PCR

	A-B	C-D	A-B/C-D	C-E3'
b3-a2	417	360	360	424
b2-a2	342	285	285	349
b3-a3	243	186	186	250
b2-a3	168	111	111	175



BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

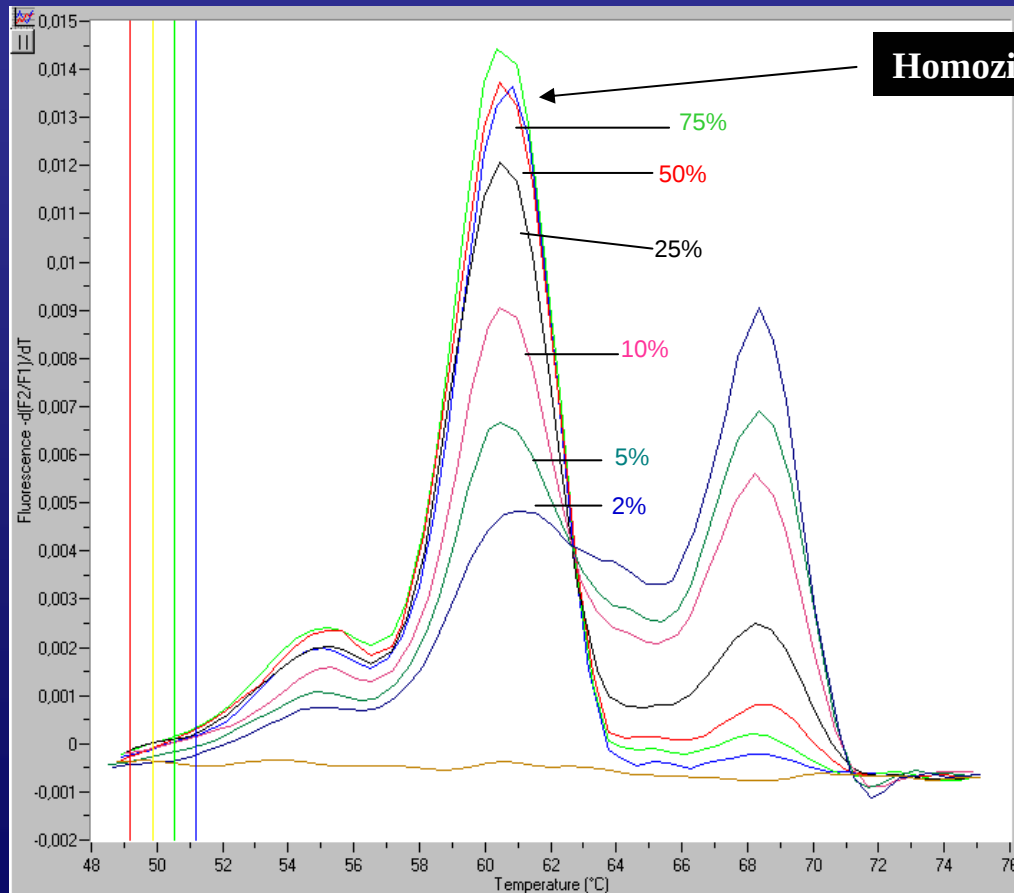
DIAGNÓSTICO/ PRONÓSTICO

- Reordenamiento de los genes de Igs y RCT:
Linfoproliferaciones reactivas vs clonales
- Traslocaciones cromosómicas:
Específico de algunas hemopatías (útil para el Dx y pronóstico)
- **Mutaciones/Polimorfismos:**
Diagnóstico: Mutaciones de *JAK-2* (exón 14)....
Inactivación /activación de genes claves: mutación *p53*...
- Expresión genética:
Valor pronóstico : *ZAP-70*, *PRAME*, *p16*...

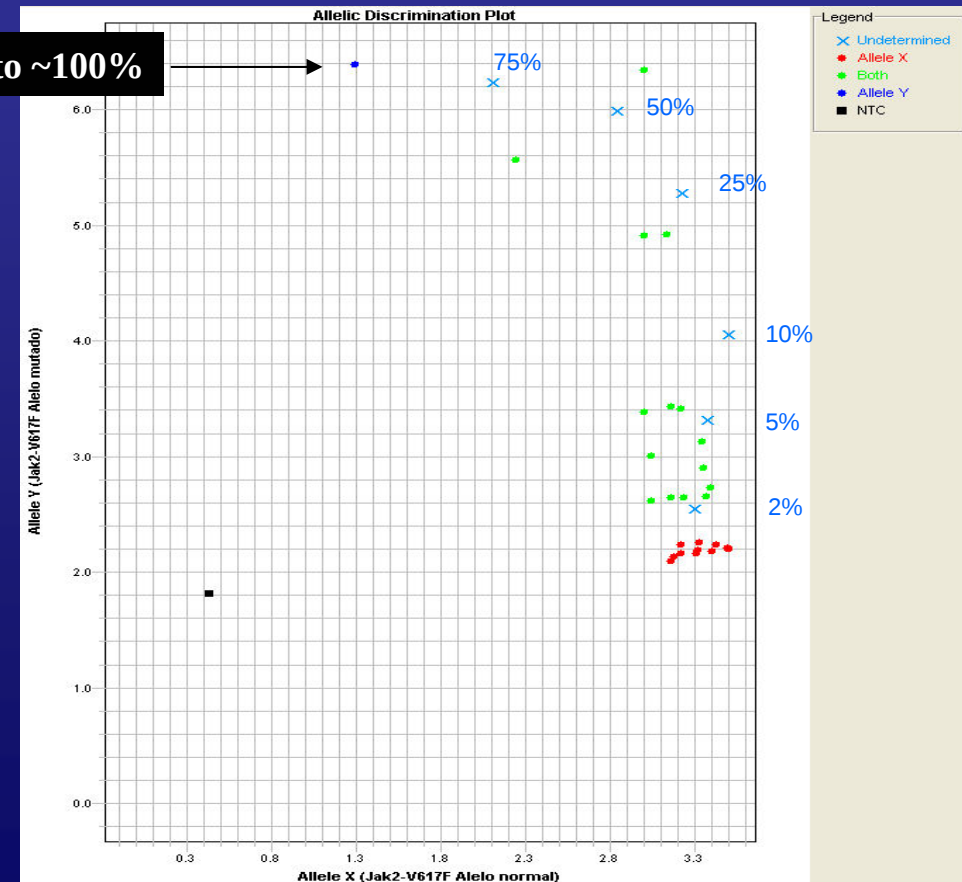
Mutación Jak2 V617F (G>T) (*Estudio Dilucional*):

Comparación sondas de hibridación vs. sondas TaqMan

Curvas de melting



Discriminación alélica

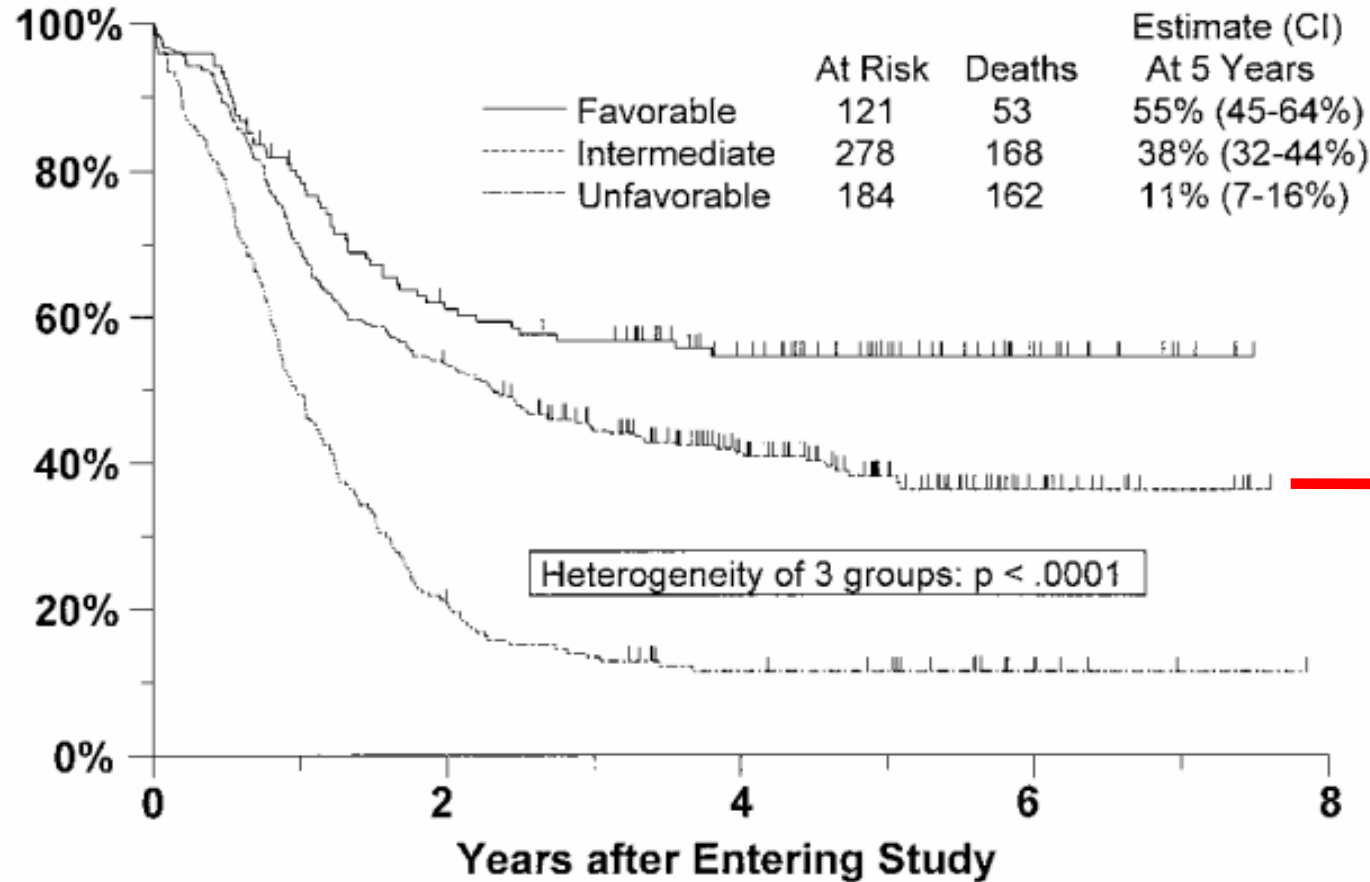


BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

DIAGNÓSTICO/ PRONÓSTICO

- Reordenamiento de los genes de Igs y RCT:
Linfoproliferaciones reactivas vs clonales
- Traslocaciones cromosómicas:
Específico de algunas hemopatías (útil para el Dx y pronóstico)
- Mutaciones/Polimorfismos:
Diagnóstico: Mutaciones de *JAK-2* (exón 14)....
Inactivación /activación de genes claves: mutación *p53*...
- Expresión genética:
Valor pronóstico : *ZAP-70*, *PRAME*, *p16*...

Grupos de riesgo: citogenética



→ **Cariotipo normal
n=244**

LMA con CN: Valor pronóstico de la expresión genética

Santamaría et al, Blood, 2009, 114:148-152.

Resultados: Score propuesto

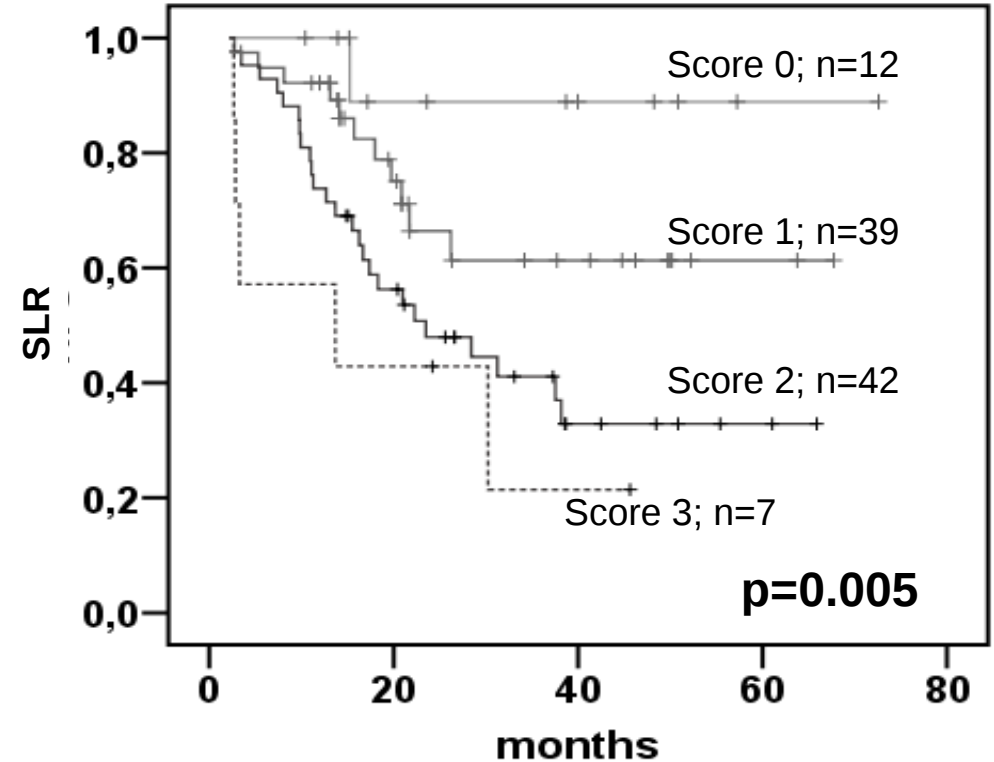
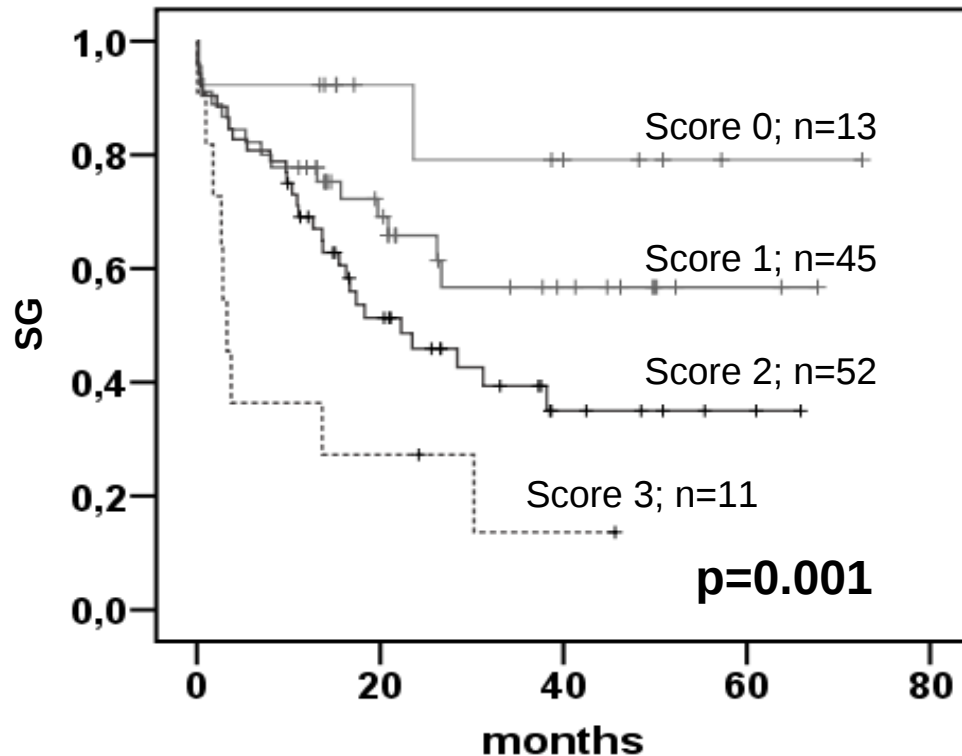


Subgrupos de “Score” 0,1,2 ó 3



Resultados: SG y SLR

Score en 121 pacientes LMA-CN



Análisis Multivariante (SG y SLR): Score, leucocitos y edad

BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

HEMOPATÍAS MALIGNAS



DIAGNÓSTICO/
PRONÓSTICO

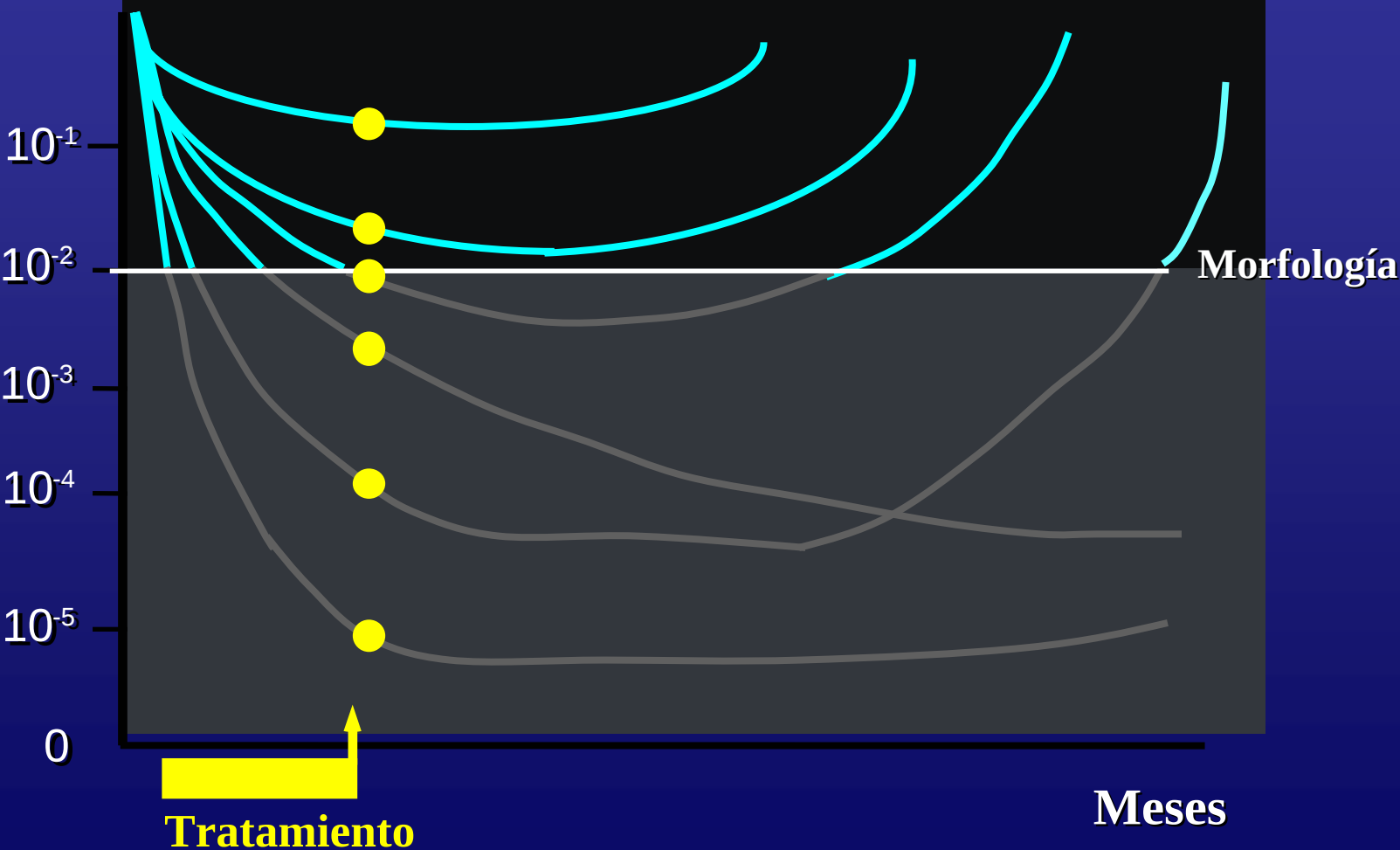


ENFERMEDAD
MÍNIMA
RESIDUAL



QUIMERISMO
HEMATOPOYÉTICO
(ALO-TRASPLANTE)

Hemopatías Malignas. Enfermedad Mínima Residual



EMR en Hemopatías. PCR cuantitativa en Tiempo real.

Marcadores*

	Neoplasias linfoides (LLA, LNH etc.)	LMA
Igs y RCT	90%	-
Traslocaciones (ADN, Genes de Fusión)	30-40%	30-40%

Otros marcadores: *WT-1, EVI1, Flt3, NPM*, Quimerismo etc.

* LMC: *BCR/ABL* (100%)

EMR en Neoplasias linfoides : Genes Igs y RCT

Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and *TAL1* deletions as PCR targets

Leukemia (1999) 13, 110-118

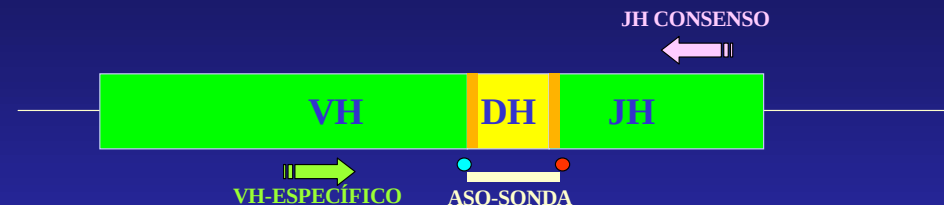
© 1999 Stockton Press All rights reserved 0887-6924/99 \$12.00

Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia

MJ Pongers-Willems¹, T Seriu², F Stolz³, E d'Aniello⁴, P Gameiro⁵, P Pisa⁶, M Gonzalez⁷, CR Bartram², ER Panzer-Grümayer³, A Biondi⁴, JF San Miguel⁷ and JJM van Dongen¹

RQ-PCR: REORDENAMIENTOS VDJ DE LOS GENES IGH

1.- ESTRATEGIA SONDA PACIENTE-ESPECÍFICA



2.- ESTRATEGIA SONDA CONSENSO



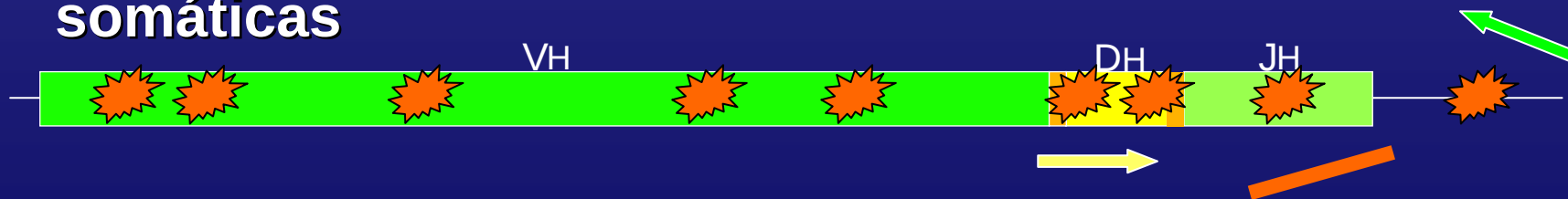
EMR en Neoplasias linfoides : Genes Igs y RCT

Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR *Leukemia (2003) 17, 1051-1057*

D González¹, M González¹, ME Alonso¹, R López-Pérez², A Balanzategui¹, MC Chillón¹, M Silva¹, R García-Sanz¹ and JF San Miguel^{1,2}

**EMR en Síndromes Linfoproliferativos maduros.
Ventaja del reordenamiento incompleto D/J sobre el
completo V/D/J**

**Mutaciones
somáticas**



NO Mutaciones somáticas



EMR en Hemopatías : Estudio de traslocaciones cromosómicas

Traslocaciones

(ADN, Genes de Fusión)

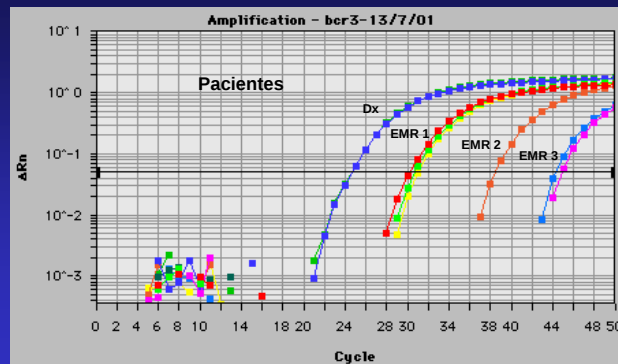
Neoplasias linfoides

30-40%

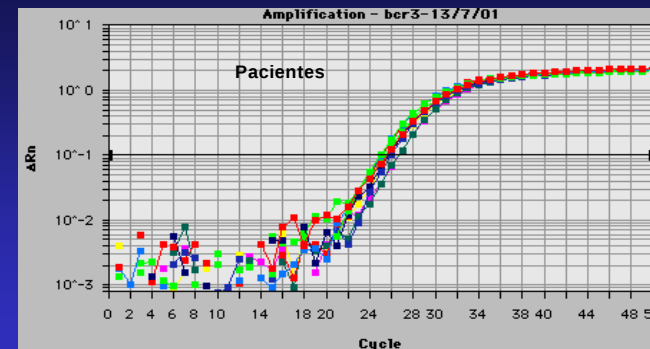
LMA

30-40%

PML/RAR α : Dx y EMR. Gen de fusión



PML/RAR α : Dx y EMR. Gen de control ABL



Cuantificación y expresión de resultados

Ratio (N° copias gen fusión/gen control)
Porcentaje (Ratio x 100)
Reducción Logarítmica.

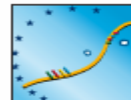
$$NCN = \frac{\text{n° copias gen diana}}{\text{n° copias gen control}} \times 10000$$

NCN: N° copias normalizadas(Programa EAC)

Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program

J Gabert^{1,17,18,19}, E Beillard^{1,17}, VHJ van der Velden², W Bi³, D Grimwade⁴, N Pallisgaard⁵, G Barbany^{6,20}, G Cazzaniga⁷, JM Cayuela⁸, H Cavé⁹, F Pane¹⁰, JLE Aerts¹¹, D De Micheli¹², X Thirion¹³, V Pradel¹³, M González¹⁴, S Viehmann¹⁵, M Malec¹⁶, G Saglio¹² and JJM van Dongen²

Leukemia (2003) 17, 2318–2357



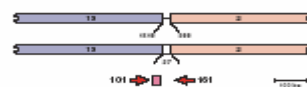
Europe Against Cancer program

Real-time quantitative PCR for early diagnosis of relapse risk in leukemia

© 1999, designed by
Department of Immunology
University Hospital Rotterdam
and Erasmus University Rotterdam

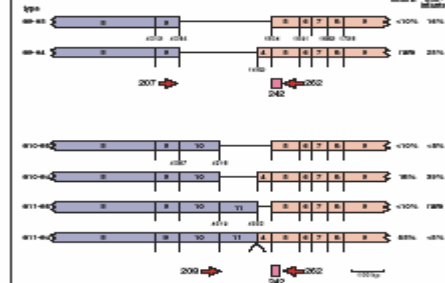
precursor-B-ALL

t(1;19)(q23;p13) with *E2A-PBX1*



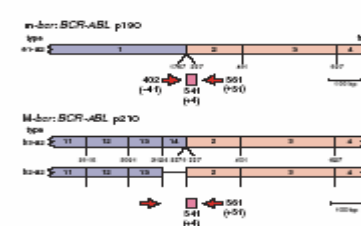
precursor-B-ALL

t(4;11)(q21;q23) with *MLL-AF4*



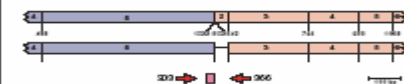
precursor-B-ALL

t(9;22)(q34;q11) with *BCR-ABL*



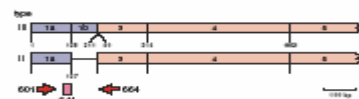
precursor-B-ALL

t(12;21)(p13;q22) with *TEL-AML1*



T-ALL

del(1)(p32;p32) with *SIL-TAL1*



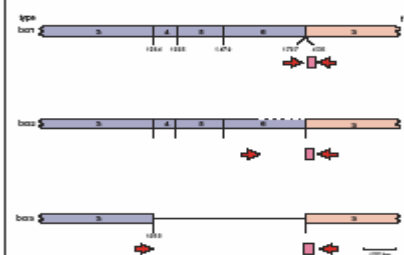
AML

t(8;21)(q22;q22) with *AML1-ETO*



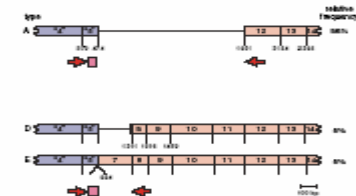
AML

t(15;17)(q22;q21) with *PML-RARA*



AML

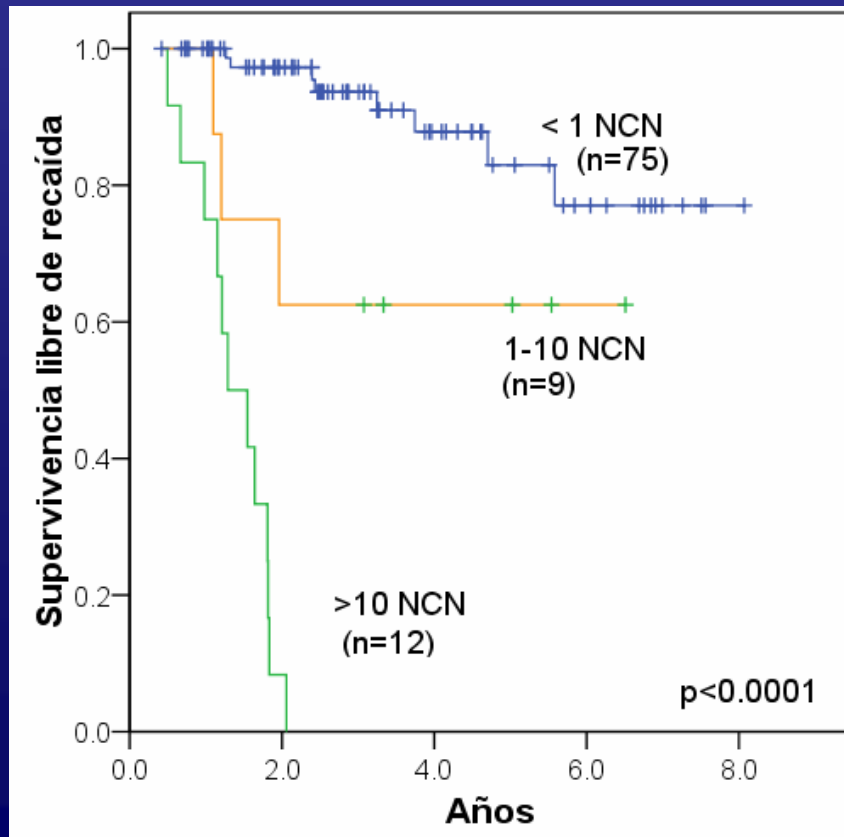
inv(16)(p13;q22) with *CBFB-MYH11*



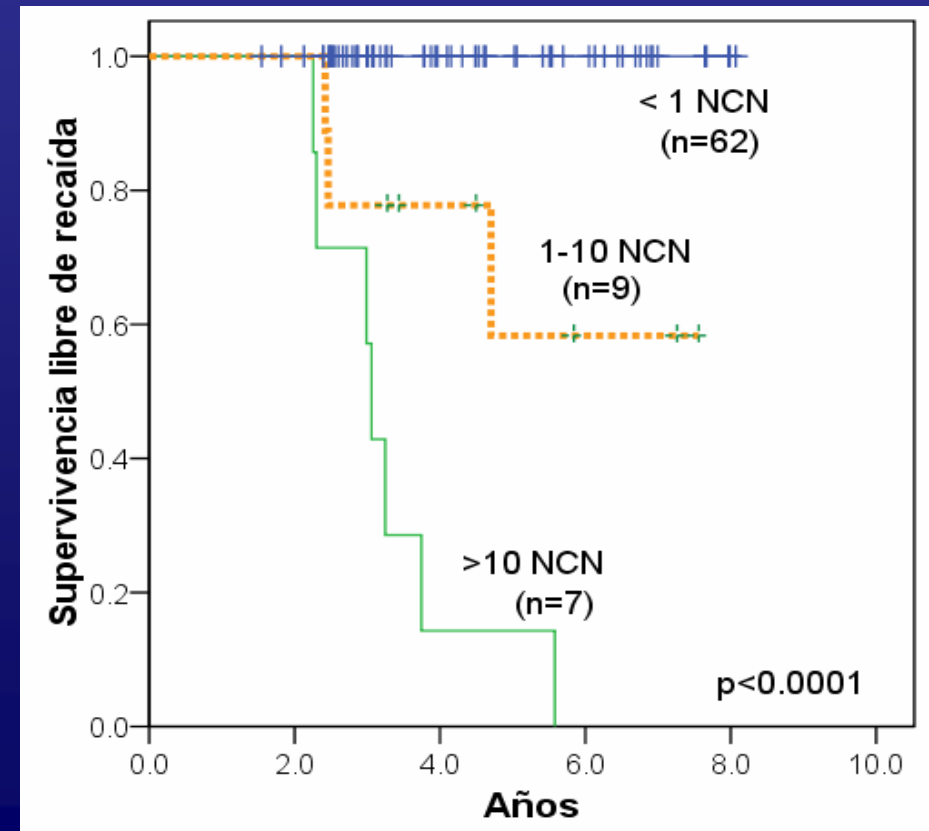
Valoración de la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) para el estudio de EMR en pacientes con Leucemia Promielocítica aguda.

Haematologica, 2007; 92:315-22 .

Mantenimiento



Fuera de tratamiento



EMR en Hemopatías. PCR cuantitativa en Tiempo real. Marcadores*

	Neoplasias linfoides (LLA, LNH etc.)	LMA
Igs y RCT	90%	-
Traslocaciones (ADN, Genes de Fusión)	30-40%	30-40%

Otros marcadores: *WT-1, EVI1, Flt3, NPM,*
Quimerismo etc.

* LMC: *BCR/ABL* (100%)

BIOLOGÍA MOLECULAR: HEMOPATÍAS MALIGNAS.

HEMOPATÍAS MALIGNAS



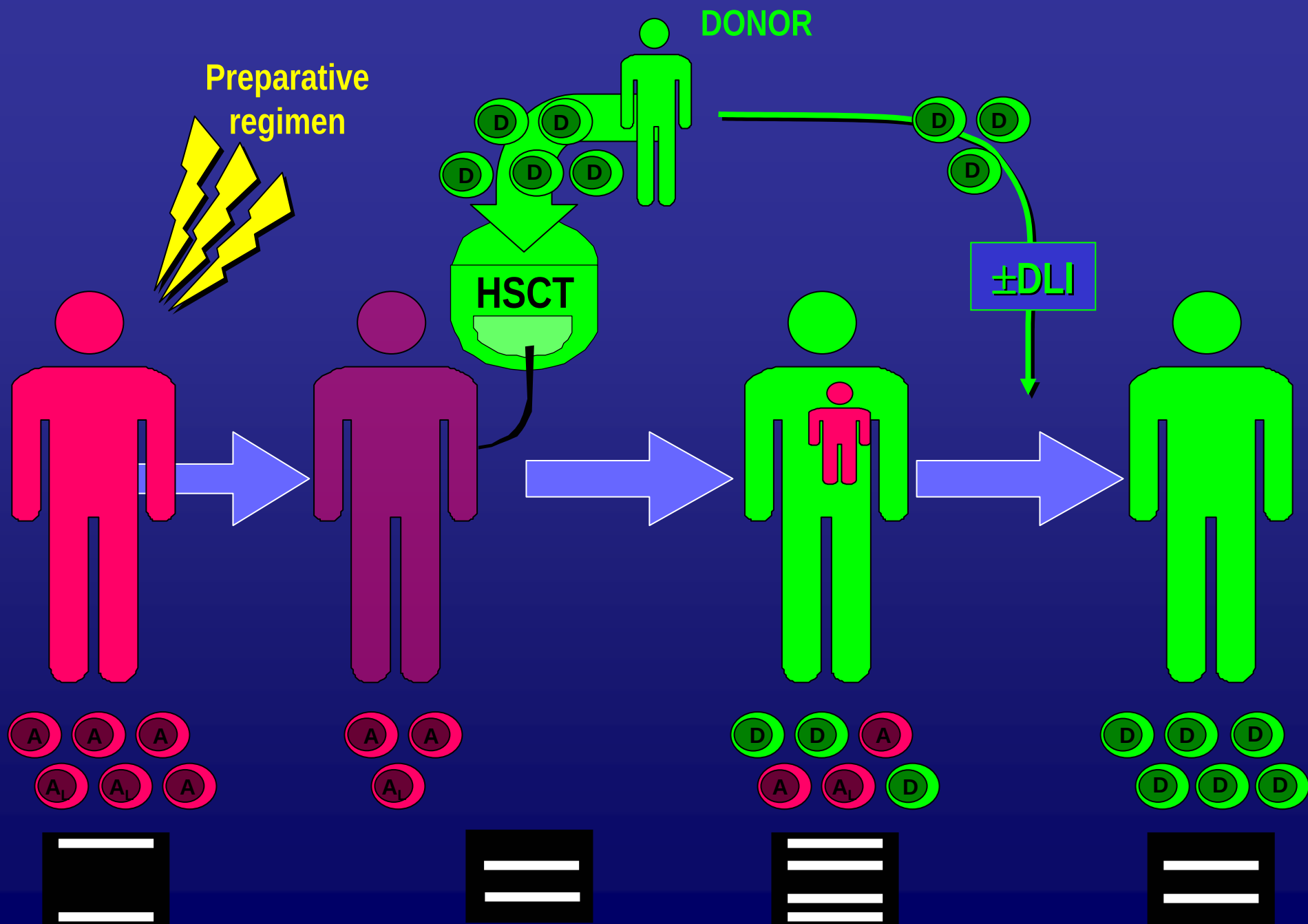
DIAGNÓSTICO/
PRONÓSTICO



ENFERMEDAD
MÍNIMA
RESIDUAL



QUIMERISMO
HEMATOPOYÉTICO
(ALO-TRASPLANTE)



QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO: INTRODUCCIÓN

- **TÉCNICAS:**

- Grupo sanguíneo
- FISH: estudio de cromosomas X e Y
- Biología molecular: polimorfismos, VNTR, STR..

- **ADN satélite**

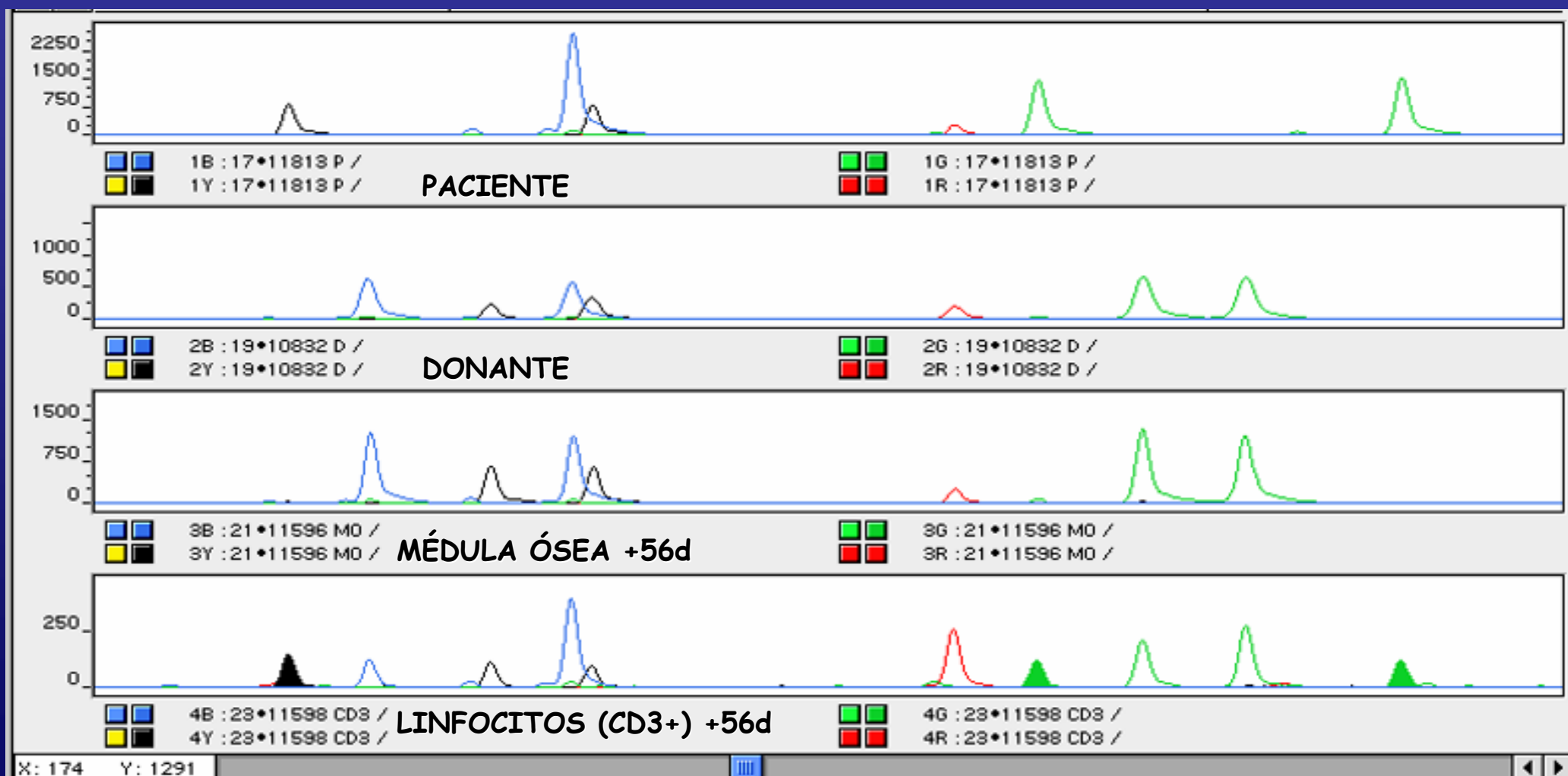
Minisatélites

Microsatélites

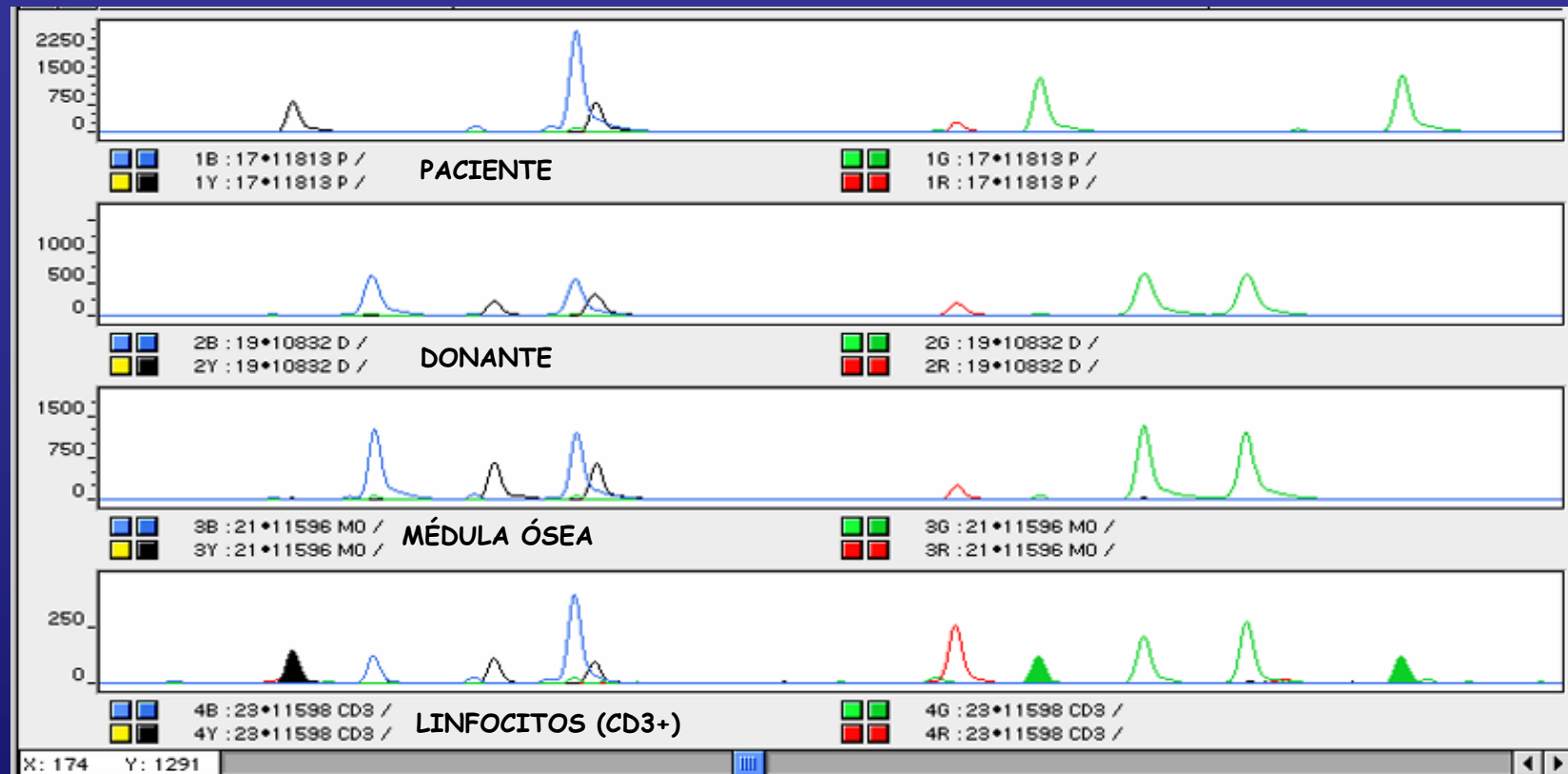
VNTR (*“Variable Number of Tandem Repeat”*)

STR (“Short Tandem Repeat”)

QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO: ANÁLISIS DE STR



QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO: ANÁLISIS DE STR



$$\% \text{ Hematopoyesis donante} = \frac{A_{D1} + A_{D2}}{A_{D1} + A_{D2} + A_{P1} + A_{P2}} \times 100$$

Técnicas Moleculares: Microarrays

(del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada)).



“ARRAYS”: Colección
ordenada de elementos

(material genético)

inmovilizados en un soporte

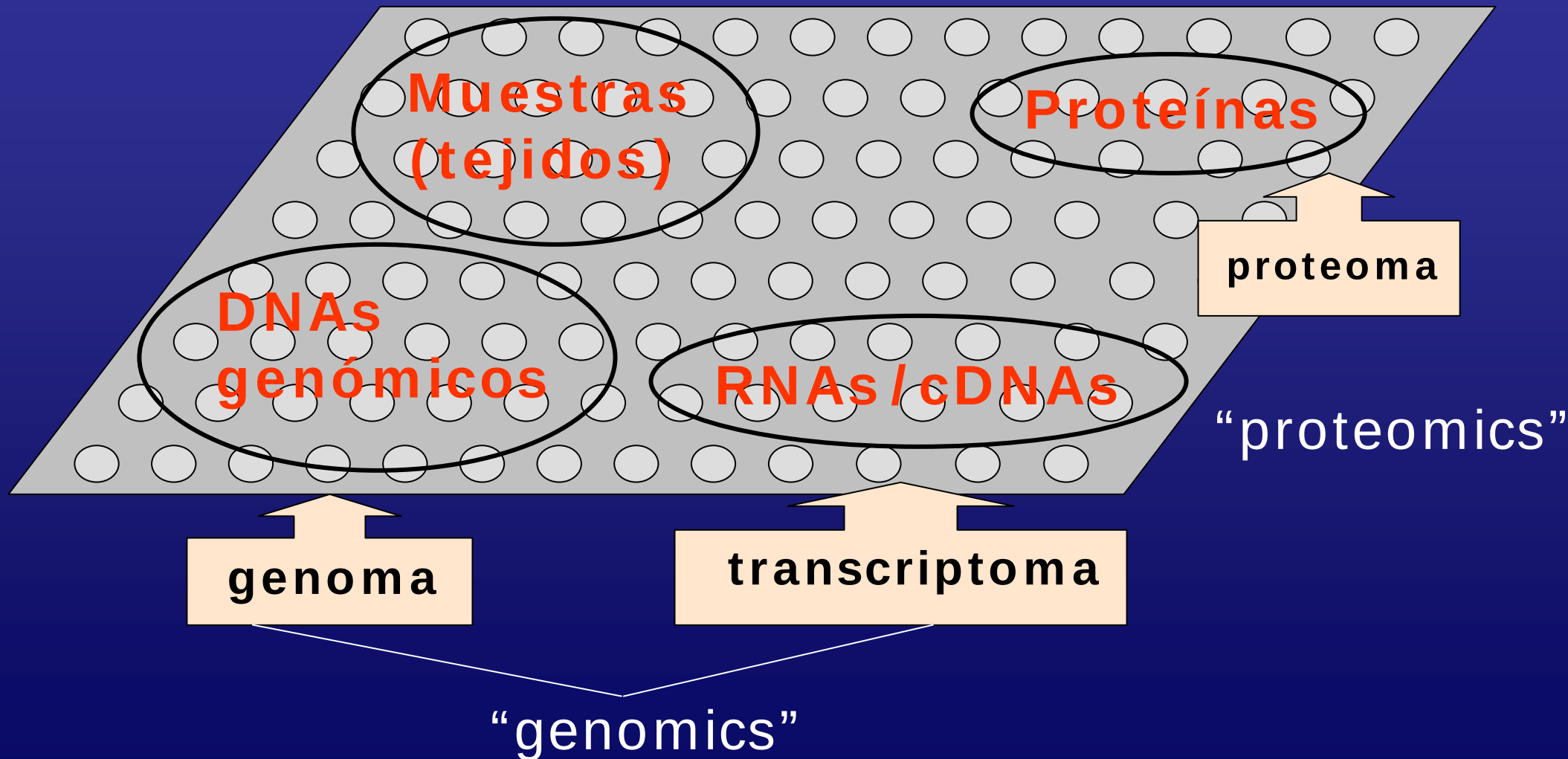
sólido *(plástico, cristal,
membrana)*

Era post-genómica:

Cantidad de mediciones
simultáneas que se
pueden realizar

ARRAY

Colección ordenada de elementos
inmovilizados en un soporte sólido



TIPOS DE ARRAYS

- **Análisis de Expresión** : *Transcriptoma*

 - Microarrays de cDNA y de oligonucleótidos**

 - Otros: Splicing alternativo, exónicos, miRNAs*

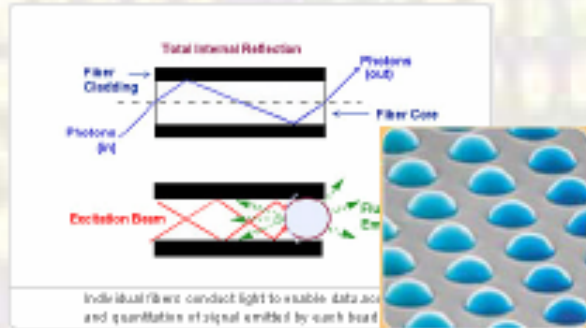
- **Análisis Genómicos:**

 - Arrays de CGH y SNPs*

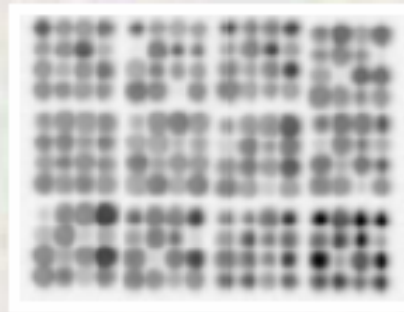
- **Análisis Epigenéticos:**

 - Arrays de Metilación y Chip-on-chip*

Tipos de microarrays de expresión

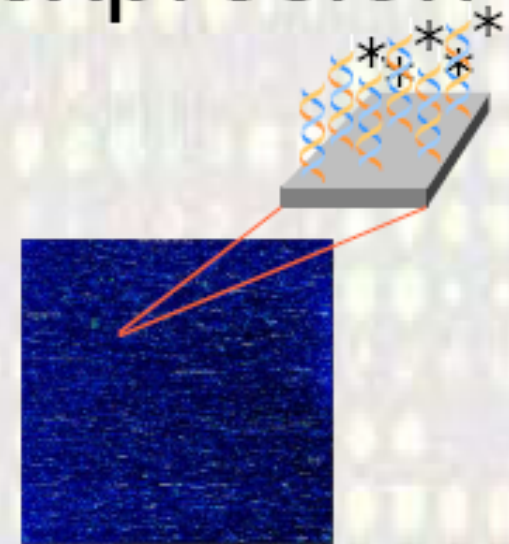


**Illumina
Bead Array**

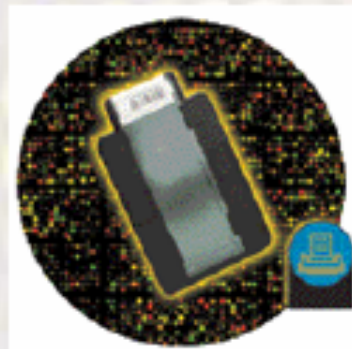


Nylon membrane

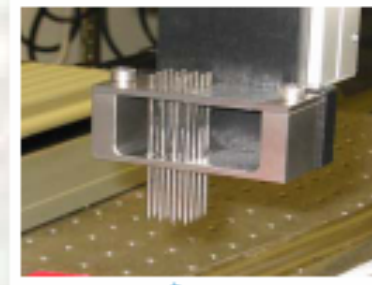
Microarrays de expresión



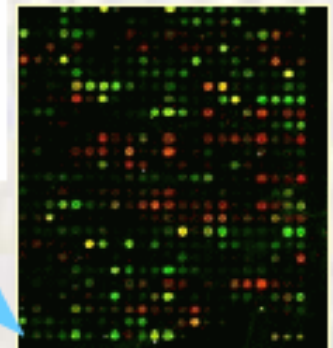
GeneChip Affymetrix



Agilent: Long oligo Ink Jet

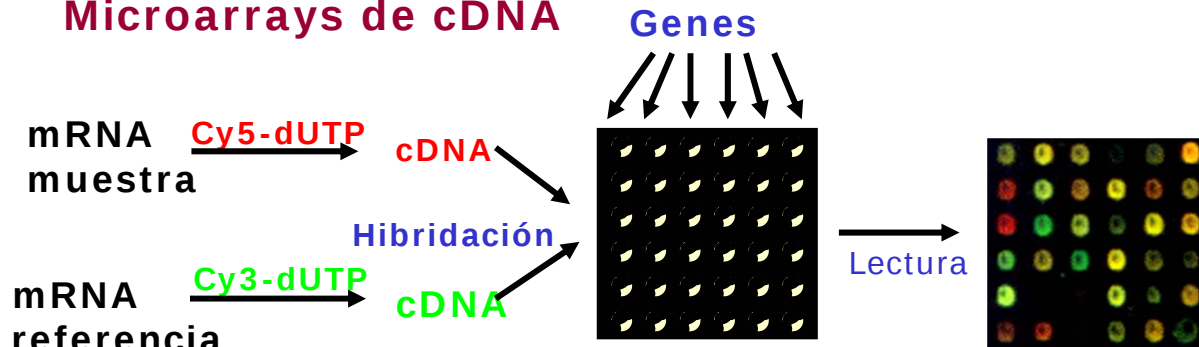


cDNA microarray

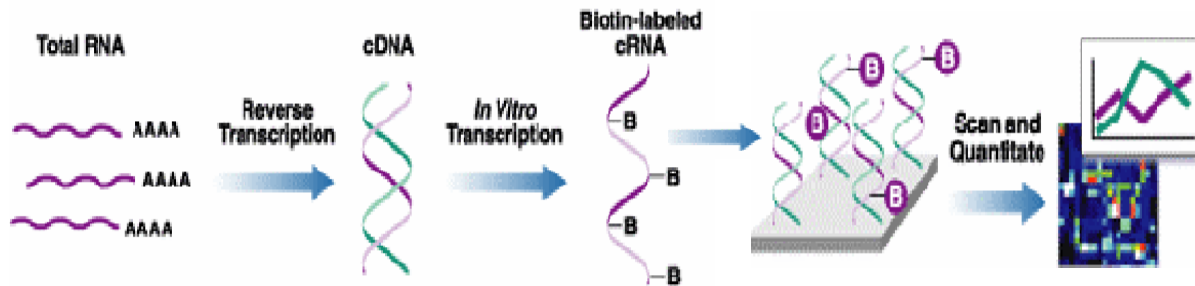


Arrays de Expresión .

Microarrays de cDNA



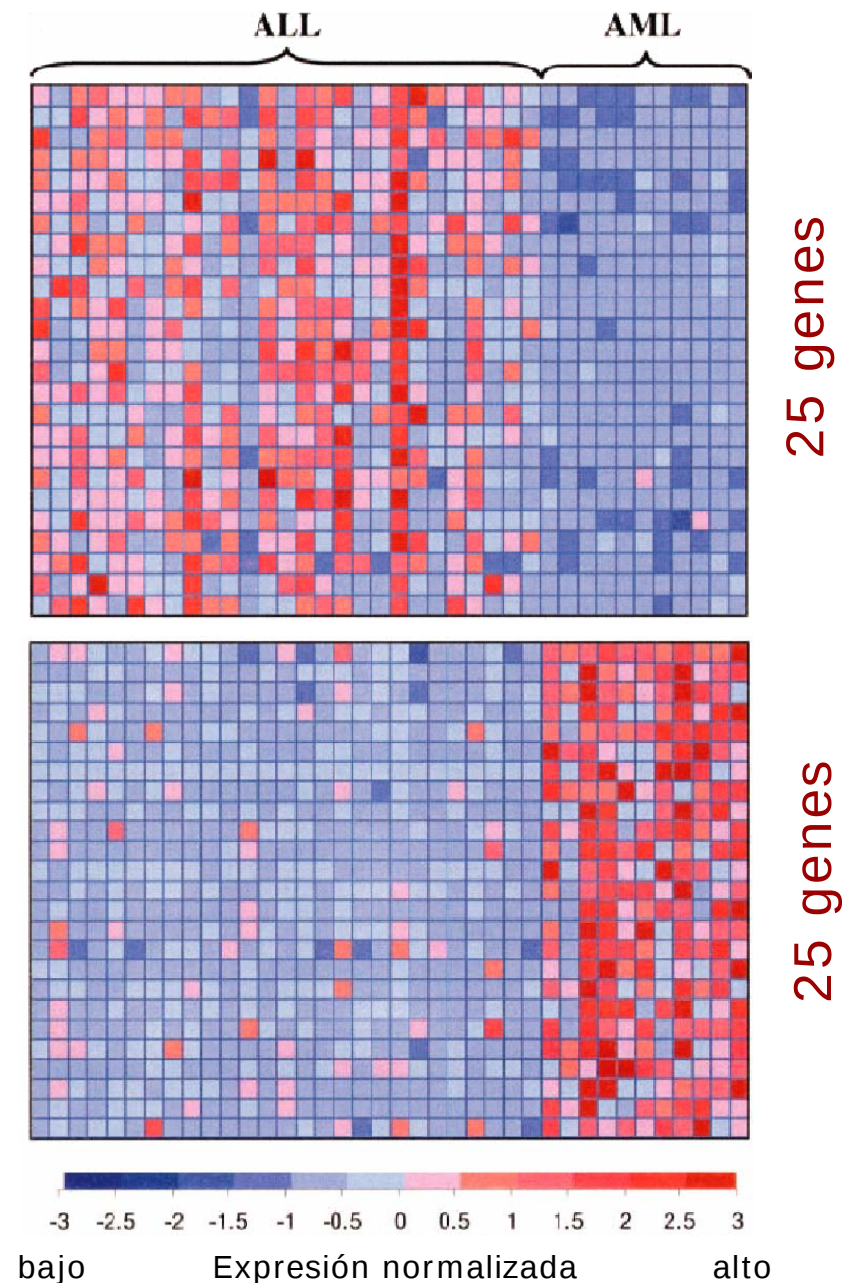
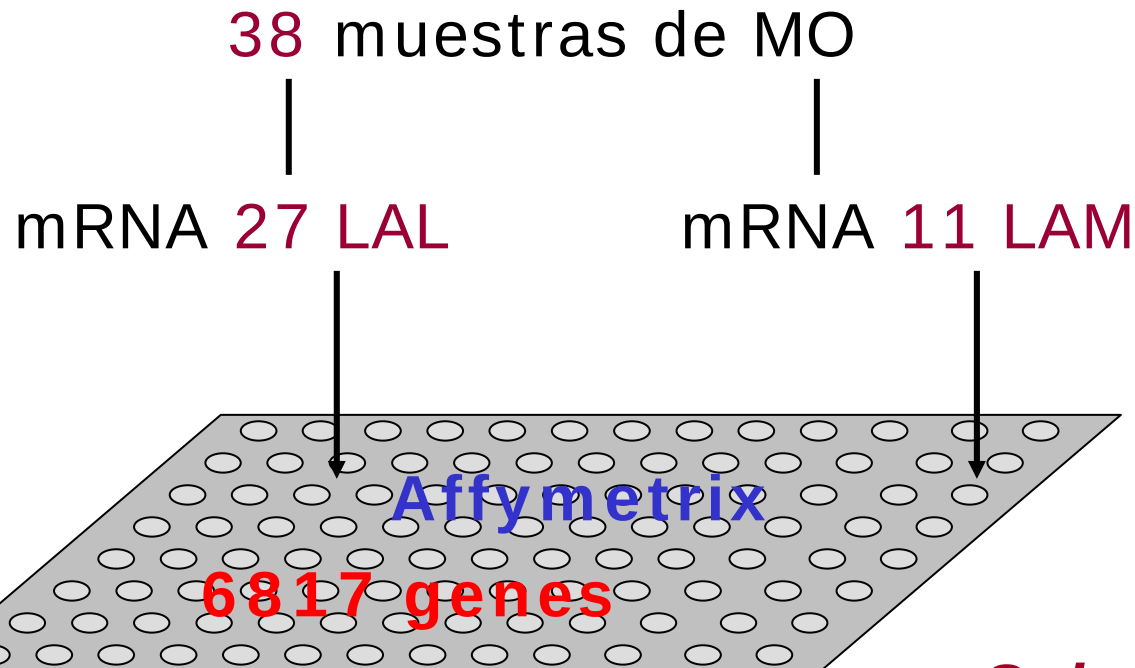
Microarrays de oligonucleótidos



- RNA codificante: 4%:
- Hibridaremos: cDNA o cRNA
- Determinar la expresión génica de un tejido (células tumorales) : **Transcriptoma**
- Estudio de genes que se expresan diferencialmente: célula normal vs tumoral
- Identificación de genes característicos de una enfermedad (**firma o "signature"**)

Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring

T. R. Golub,^{1,2*†} D. K. Slonim,^{1†} P. Tamayo,¹ C. Huard,¹
M. Gaasenbeek,¹ J. P. Mesirov,¹ H. Coller,¹ M. L. Loh,²
J. R. Downing,³ M. A. Caligiuri,⁴ C. D. Bloomfield,⁴
E. S. Lander^{1,5*}

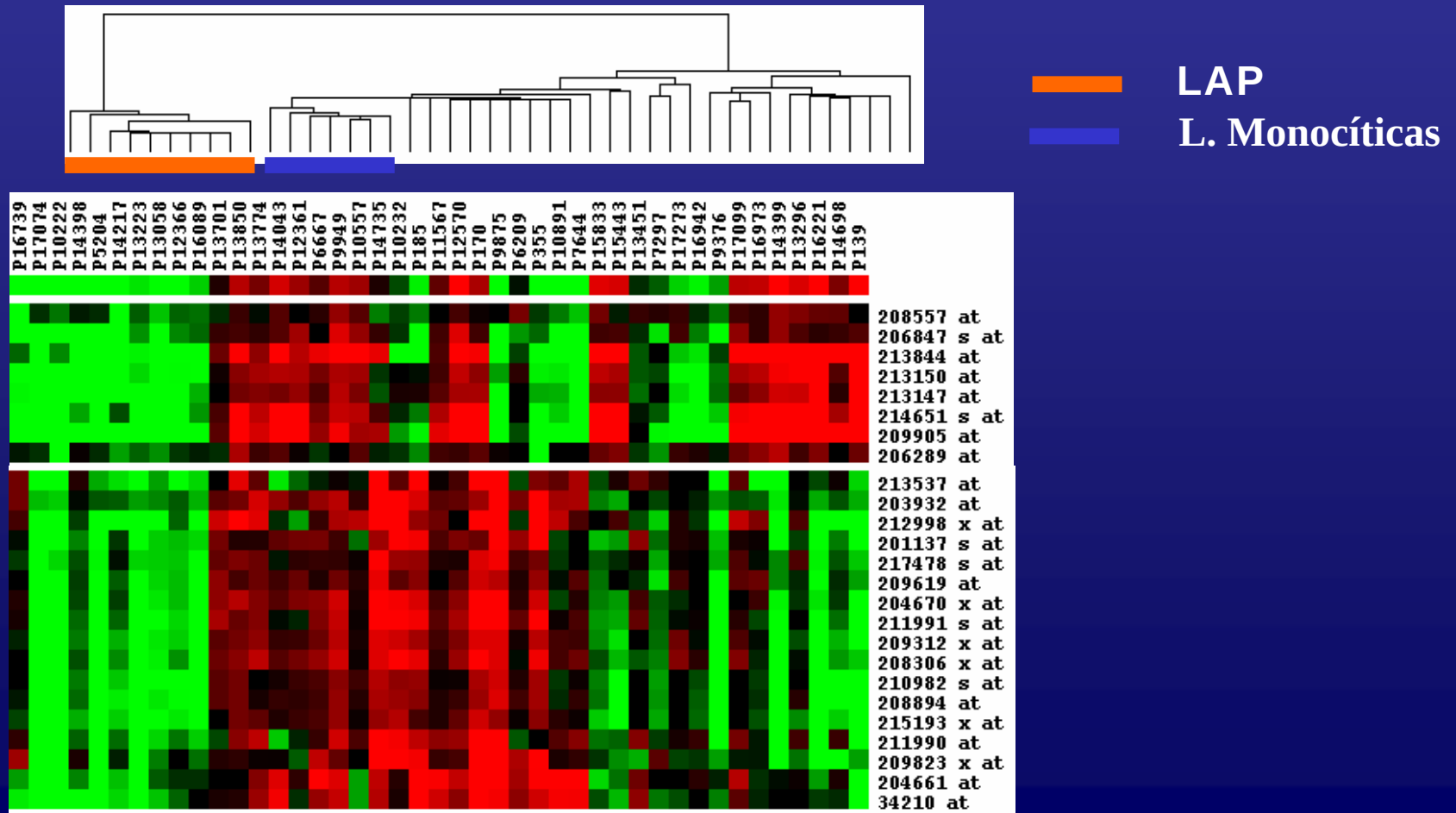


Science 1999, 286: 531-537

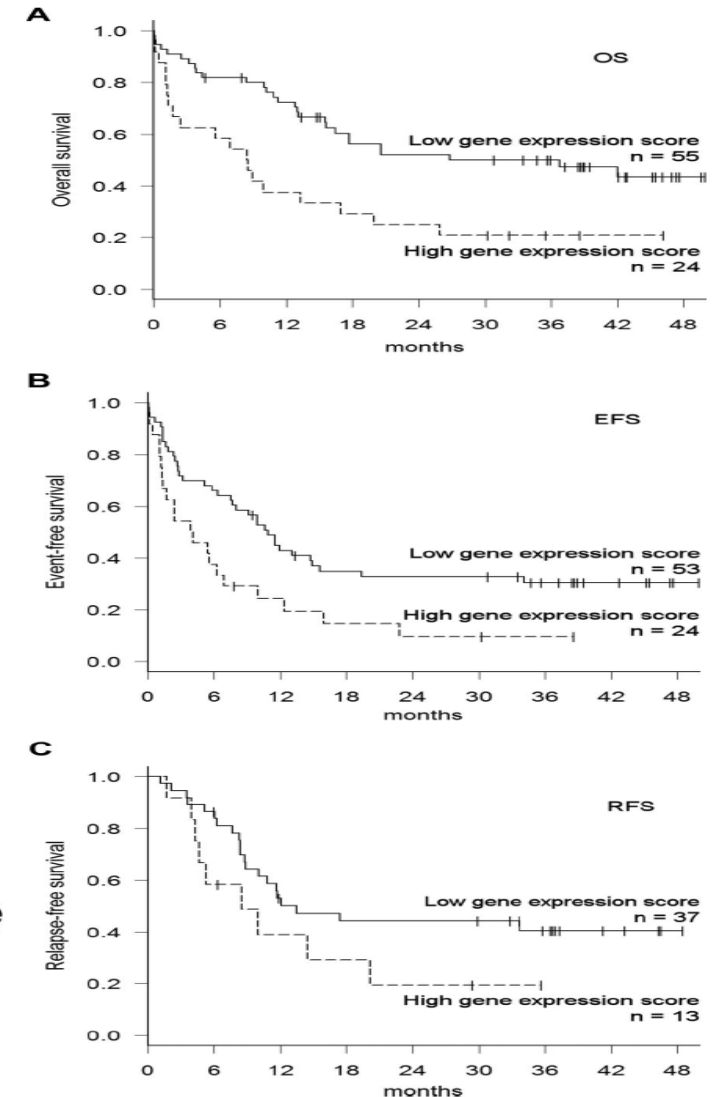
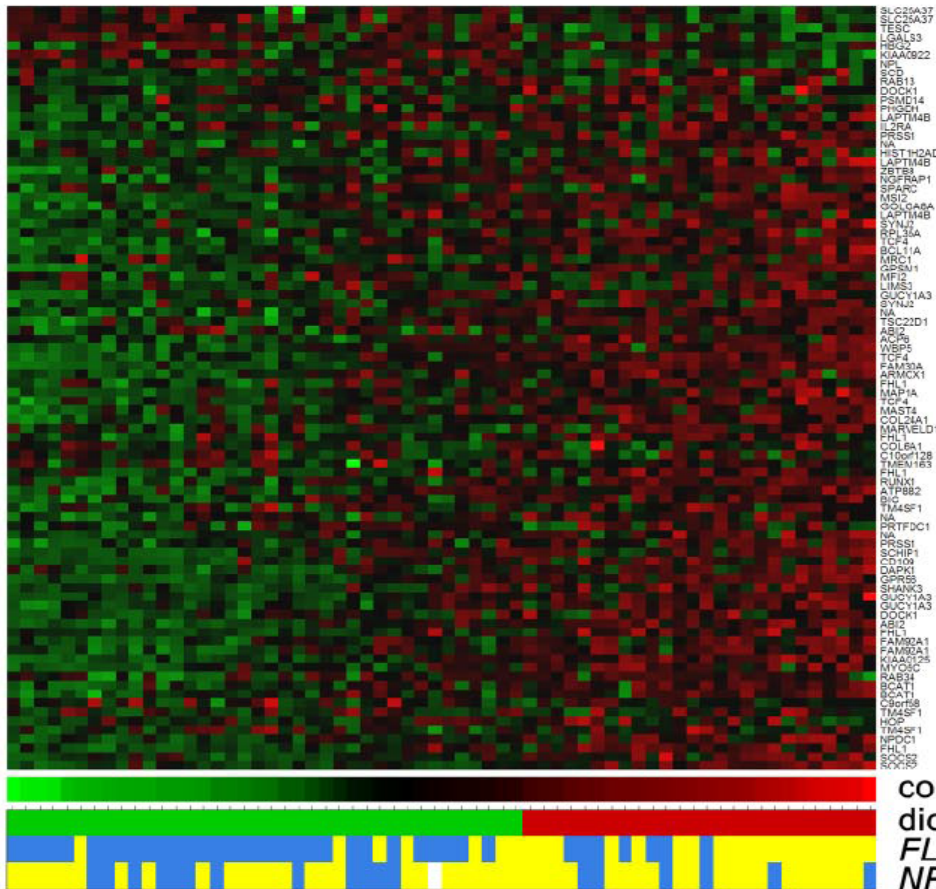
Clasificación de la LMA según su expresión génica.

Deregulación de genes según el subtipo de LMA.

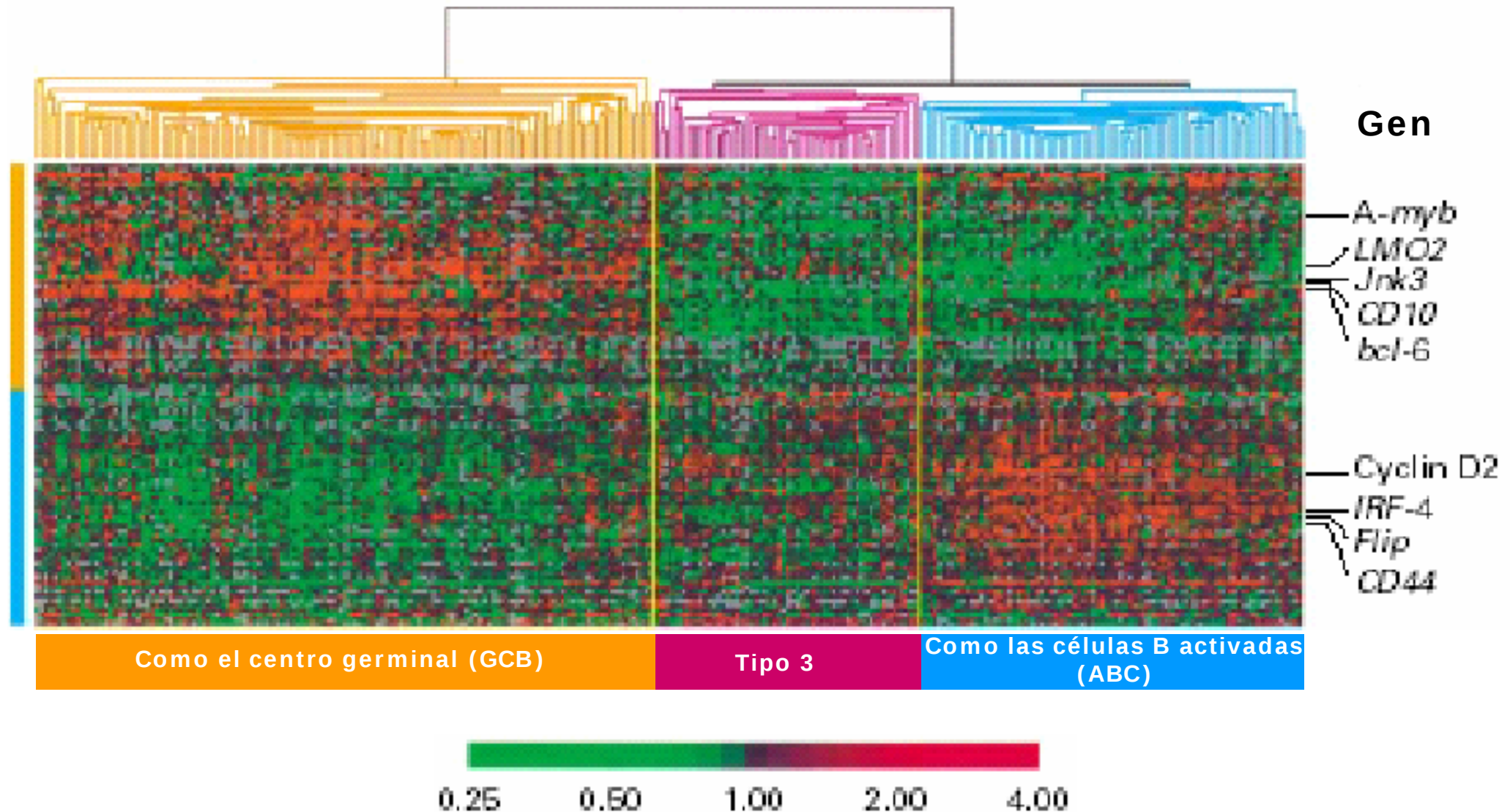
Gutiérrez et al, Leukemia, 2005; 19:402-09.



An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. (Metzeler et al. *Blood*. 2008;112:4193-4201)



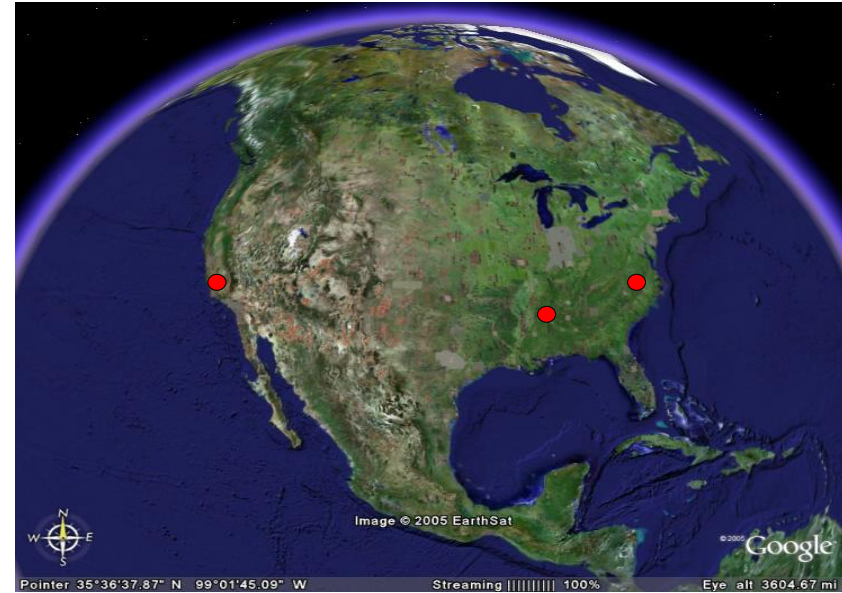
Subgrupos de linfomas B de células grandes identificados mediante microarrays



Estudio MILE (*Microarray Innovations in LEukemia*)



- Centro 1 Montpellier / France
- Centro 2 Munich / Germany
- Centro 3 Berlin / Germany
- Centro 4 Rome / Italy
- Centro 5 Padua / Italy
- Centro 6 Salamanca / Spain
- Centro 7 Cardiff / UK



- Centro 8 San Diego, CA
- Centro 9 Memphis, TN
- Centro 10 LabCorp, NC
- Centro 11 Singapur

TIPOS DE ARRAYS

- Análisis de Expresión : *Transcriptoma*

 - Microarrays de cDNA y de oligonucleótidos**

 - Otros: Splicing alternativo, exónicos, **miRNAs***

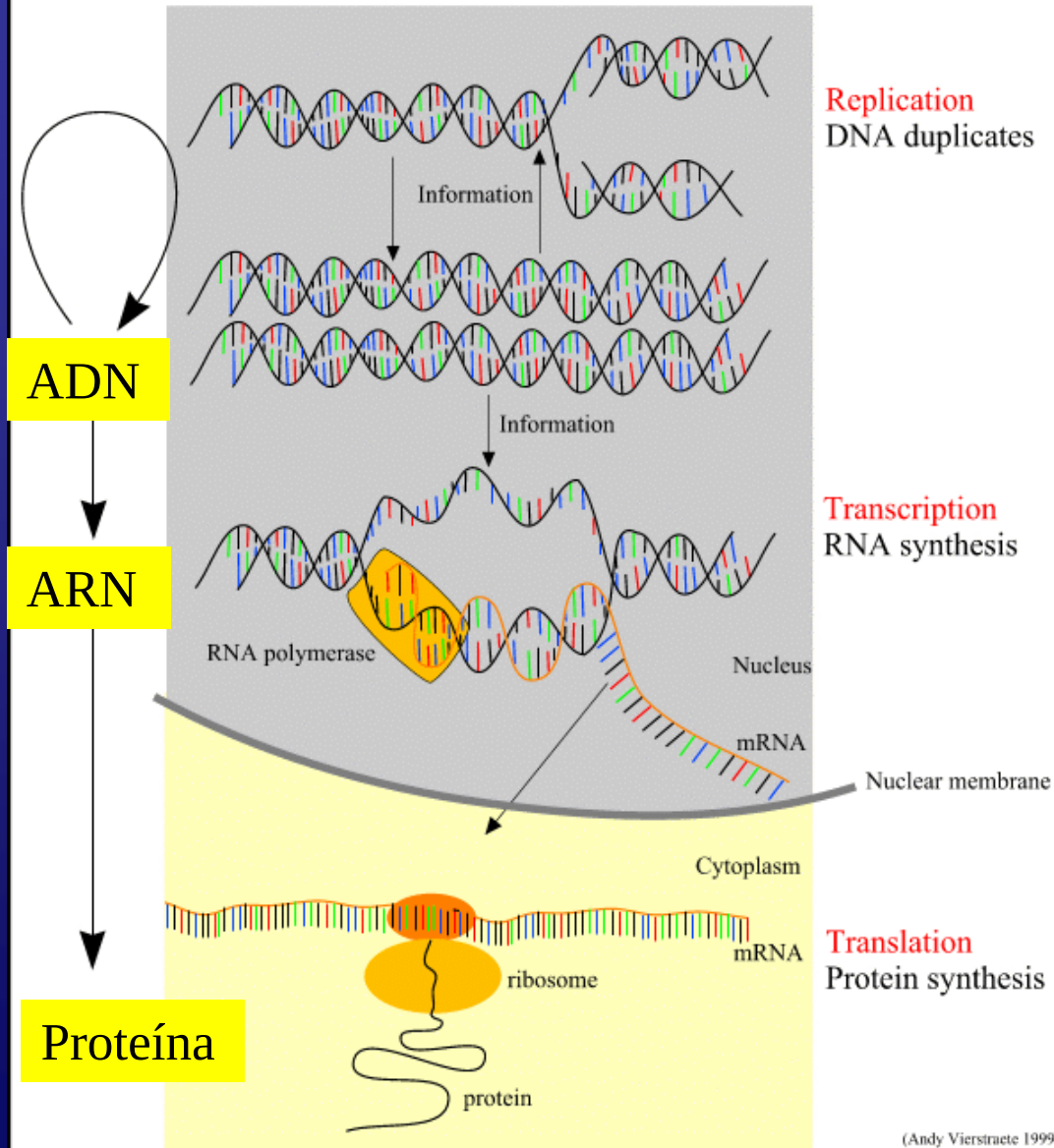
- Análisis Genómicos:

 - Arrays de CGH y SNPs*

- Análisis Epigenéticos:

 - Arrays de Metilación y Chip-on-chip*

Dogma Central de la Biología Molecular



Micro RNA

- ARN pequeños (19-22 nt) no codificantes que regulan la expresión génica.
- Regulan : proliferación, diferenciación, apoptosis.
- N° de 462 (predichibles 1000), muy conservados (*importante vía de regulación*)
- Cada miRNA controla cientos de genes y muchos ARNm diferentes “*targets*” para distintos miRNA.
- Intervienen en el inicio y progresión de tumores

Normal
condition

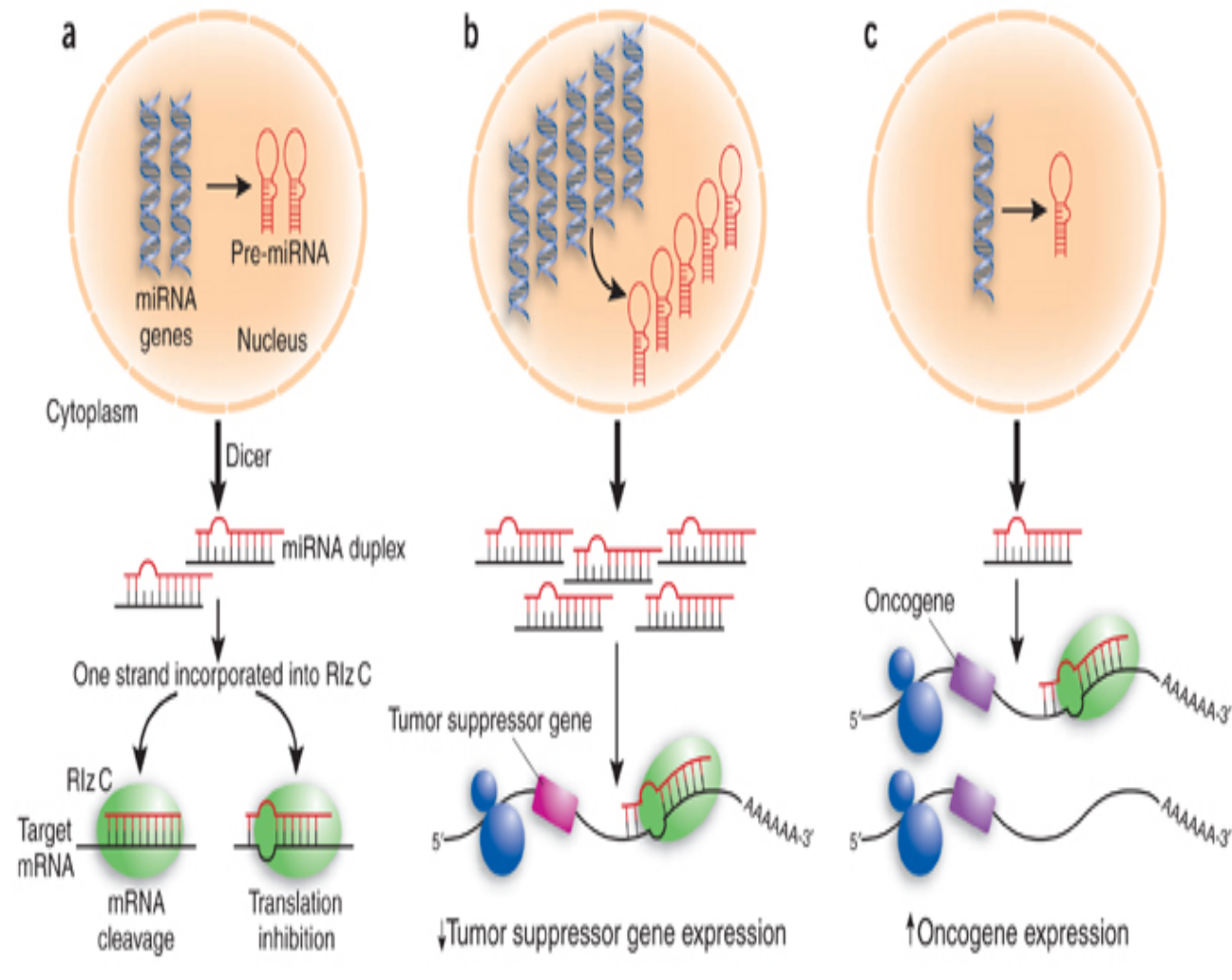
Overexpression
of miRNAs

Underexpression of
miRNAs

Micro RNA

Mecanismos de actuación

Expresión aberrante: Sobre o Infra
Mutaciones genómica y somáticas
Polimorfismos en el ARNm diana



Expresión
Normal

MicroRNA como
gen supresor

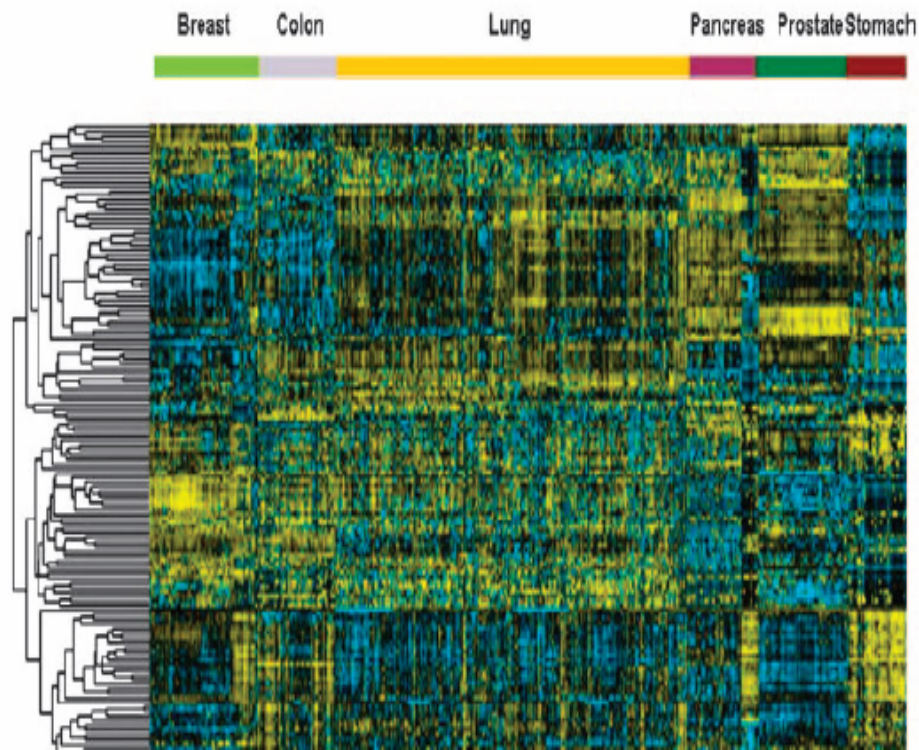
MicroRNA
como oncogen

*Calin et al, NEJMed, 2005,
Calin & Croce , Nature Rev Cancer, 2006,
Esquela-Kerscher & Slack, Nature Rev, 2006
Symposium, Best of ASH, Atlanta, 2007*

ARRAYS DE EXPRESIÓN.

Micro RNA

La expresión de miRNAs clasifica las neoplasias humanas



Volinia S. PNAS 2006

MicroRNA Expression in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia

Guido Marcucci, M.D., Michael D. Radmacher, Ph.D., Kati Maharry, M.A.S., Krzysztof Mrózek, M.D., Ph.D., Amy S. Ruppert, M.A.S., Peter Paschka, M.D., Tamara Vukosavljevic, B.S., Susan P. Whitman, Ph.D., Claudia D. Baldus, M.D., Christian Langer, M.D., Chang-Gong Liu, Ph.D., Andrew J. Carroll, Ph.D., Bayard L. Powell, M.D., Ramiro Garzon, M.D., Carlo M. Croce, M.D., Jonathan E. Kolitz, M.D., Michael A. Caligiuri, M.D., Richard A. Larson, M.D.,

N ENGL J MED 358:18 www.NEJM.ORG MAY 1, 2008

Table 2. MicroRNA Probes Forming the Outcome Signature in the Training Group.

Target MicroRNA ^a	MicroRNA Probe Sequence	Cox Regression Coefficient ^b	P Value ^c
Increased expression associated with decreased risk			
183a	TCAGGCTTGCTCAGTCGACATTCAGCGCTGCGTGAGTT	-0.61	1.4×10 ⁻⁴
183a	TCAGAGGACTCCAGGGAACATTCGACGCTGCGTGAGTT	-0.52	0.002
183b	TTTAAAGGTCAGCAATGAATTCATTCGCTGCGTGAGTT	-0.57	3.0×10 ⁻⁴
183b	CTGATGCTGCACTCAGATTCATTCGCTGCGTGAGTT	-0.41	0.001
183b	AGCATTATTCGCTGCGTGCGTGAGTTCGCTGCGAGAG	-0.40	0.004
Increased expression associated with increased risk			
124	TTAAGGCA CGCGGTGATGCGAAGAGCGGAGCTACGGCT	0.97	0.004
128-1	TTGATTTCGGGGCGTAGCACTGTCTGAGAGGTTTACATT	1.73	0.002
194	TGTAAAGCAACTCGATCTGACTGTGATCAATTTCCAG	1.02	0.004
219-5p	ATTGTCGAAAGCAATTCGAGTCTATGGCTCCGCGCA	1.75	7.1×10 ⁻⁴
230a	TGTGGCATTGTAGGGCTCCAGACCGTATCTGACATTTGG	0.77	0.001
330	CAGTCGGAGAAAGCTGGTTGAGAGGGGAAAGAGGATGA	1.40	0.003
330	GAAGA GCTGGTTGAGAGGGGAAAGAGGATGAGGTCCT	1.25	0.003

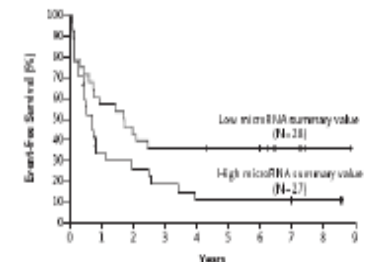
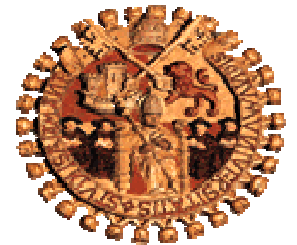
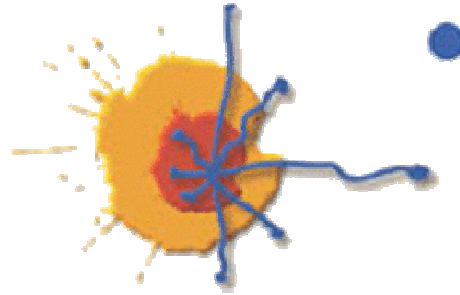


Figure 2. Event-Free Survival in the Validation Group, According to the MicroRNA Summary Value.

For the purpose of display, the microRNA summary value was dichotomized on the basis of the median value to separate patients into two groups, and Kaplan-Meier curves were generated to depict outcomes. The microRNA summary value reflects the expression levels of the microRNAs forming the outcome signature derived from the training group, as calculated for patients in the validation group.

MicroRNA expression profiling in multiple myeloma: correlation with genetic abnormalities



Dra. N. Gutiérrez.

Departamento de Hematología. Hospital Universitario. Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca.

Washington, 2009

CONCLUSIONS

- MicroRNA expression is deregulated in myeloma cells with a predominance of a decrease in microRNA levels.
- The microRNA pattern of expression in MM seems to be associated with specific genetic abnormalities, which supports a role for microRNAs in the pathogenic pathways of MM.
- MM samples with t(14;16) show an up-regulation of the cluster miR-1/miR-133a.

TIPOS DE ARRAYS

➤ Análisis de Expresión : *Transcriptoma*

Microarrays de cDNA y de oligonucleótidos

Otros: Splicing alternativo, exónicos, miRNAs

➤ Análisis Genómicos:

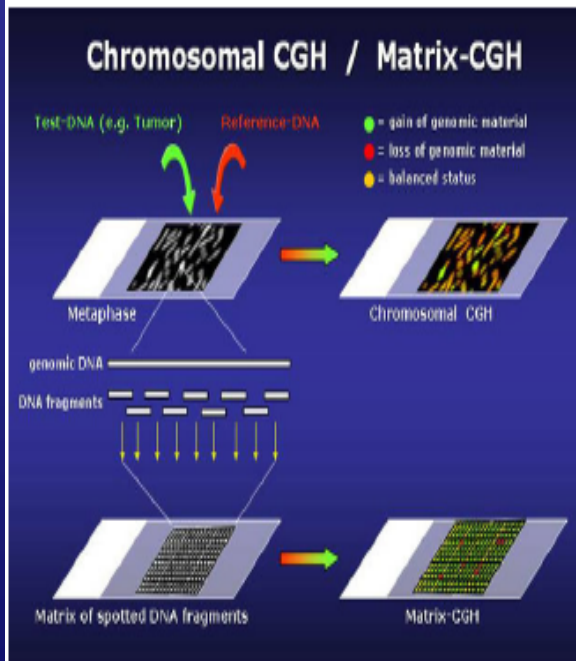
Arrays de CGH y SNPs

➤ Análisis Epigenéticos:

Arrays de Metilación y Chip-on-chip

Análisis Genómicos

5.- Arrays de CGH (Comparative Genomic Hybridization)



- Detección cuantitativa de pérdida o ganancia de regiones cromosómicas
- No permite la detección de alteraciones cromosómicas estructurales como translocaciones, inversiones...

6.- Arrays de SNPs



- Estos arrays son utilizados para el análisis de variaciones de un único nucleótido en la secuencia genómica (Single Nucleotide Polymorphism)
- Farmacogenómica: terapias específicas individuales
- Al igual que los CGH arrays, además de poder analizar pérdidas y ganancias genómicas, los arrays de SNPs nos permiten analizar pérdidas de heterocigosidad (LOH) debido a una disomía uniparental

SNPs: Aplicaciones

1.- Estudios de Copy number Variation

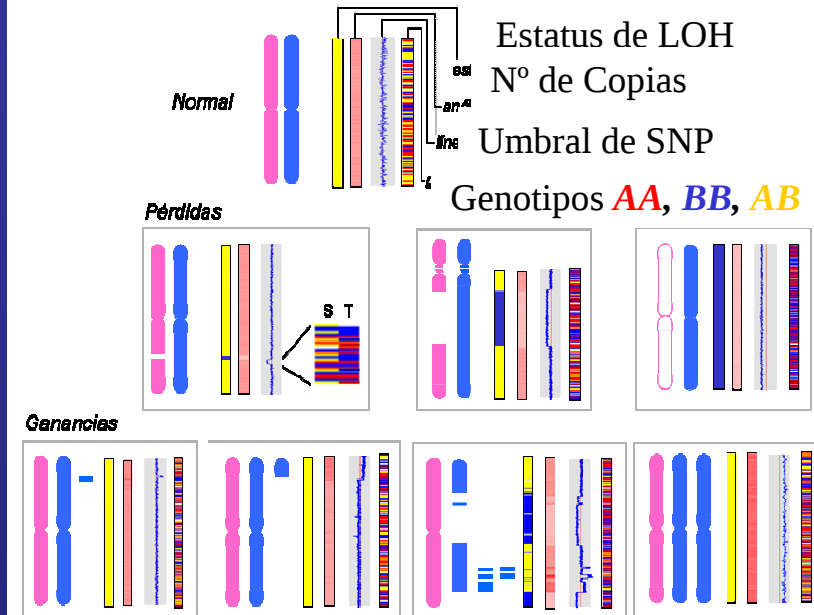
ADN TUMORAL

2. Estudios de asociación:
SNPs y riesgo de enfermedad

3. Farmacogenética
SNPs y respuesta a fármacos

ADN NORMAL

Identificación de pérdidas y ganancias



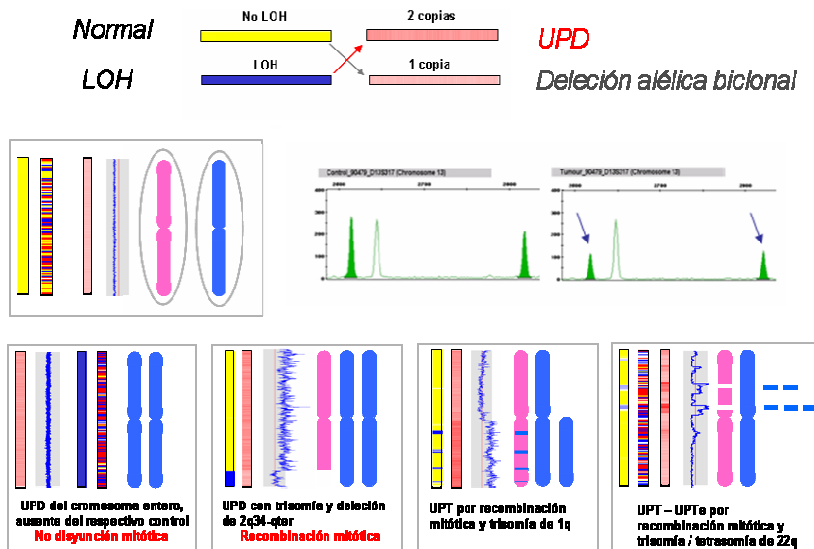
Arrays de SNP de alta densidad

Nº copias de ADN,

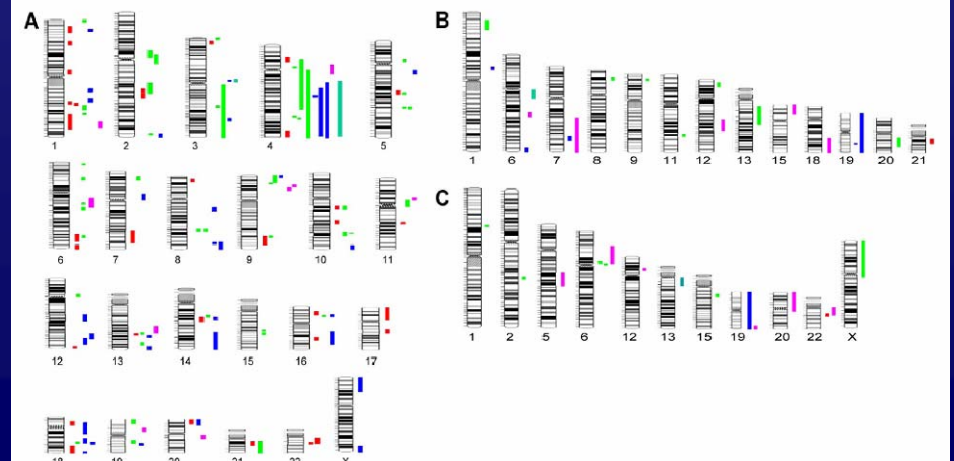
Pérdida de heterogocisidad (LOH)

Disomía uniparental (DUP)

Identificación de delección alélica biclonal y UPD



Ideograma Genómico



SNPs: Aplicaciones

1.- Estudios de Copy number Variation

ADN TUMORAL

2. Estudios de asociación:
SNPs y riesgo de enfermedad

3. Farmacogenética
SNPs y respuesta a fármacos

ADN NORMAL

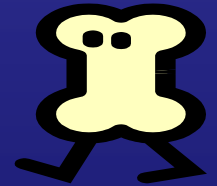
PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

ALTAS DOSIS QUIMIOTERAPIA

TRASPLANTE AUTÓLOGO

TERAPIA DE SOPORTE

TRATAMIENTO CON BIFOSFONATOS



Complicaciones óseas



DESARROLLO DE
OSTEONECROSIS
MANDIBULAR



NO DESARROLLO DE
OSTEONECROSIS
MANDIBULAR

ANALIZAR SI EL COMPONENTE GENÉTICO
JUEGA
UN PAPEL EN LA APARICIÓN DE
OSTEONECROSIS MANDIBULAR ASOCIADA A BP

Estudio casos-contróles

Casos: Pacientes con MM+BP+CON Osteonecrosis

Contróles: Pacientes con MM+BP+SIN Osteonecrosis

Resultados análisis SNPs

Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas 4 SNPs en CYP2C8:

Allele distribution							Genotype Distribution			
		Cases	Controls	P value	Pc	ORs (CI 95%)		Cases	Controls	P value
Rs1934951 Intron 8	C	52%	87%	0.000001	0.02	12.75 (3.7-43.5)	CC	19%	75%	.000002
	T	48%	13%				CT	66%	25%	
							TT	14%	0%	
Rs1934980 Intron 5	A	23/42	113/128	0.000004	0.09	13.88 (4.0-46.7)	AA	4/21	49/64	.00002
	G	19/42	15/128				AG	15/21	15/64	
							GG	2/21	-	
Rs1341162 Intron 5	C	22/44	109/130	0.000006	0.13	3.27 (3.5-49.9)	CC	3/22	44/65	.000003
	T	22/44	21/130				CT	16/22	21/65	
							TT	3/22	-	
Rs17110453 Region 5'	A	25/44	112/128	0.000022	0.46	10.2 (3.2-32.1)	AA	5/22	48/64	.000019
	C	19/44	16/128				AC	15/22	16/64	
							CC	2/22	-	

* Pc: Bonferroni corrected p-value; S OR: The Odds Ratio was calculated assuming a dominant model of inheritance

Resultados análisis SNPs

Análisis haplotipos

rs1934951	rs1934980	rs1341162	Case Frequency (2n=42)	Control Frequency (2n=128)
C	A	C	0.500 50%	0.836 83.6%
T	G	T	0.452 45.2%	0.109 10.9%
Otros minoritarios			0.048 4.8%	0.055 5.5%

p=5.05E-06

CONCLUSIONES

El SNP rs1934951 localizado en el gen *CYP2C8* se asocia con un mayor riesgo de desarrollar un proceso de Osteonecrosis Mandibular.

A EFECTOS PRÁCTICOS:

Pacientes con el alelo T en rs1934951 tienen mayor riesgo de desarrollar ONM

Valorar el riesgo-beneficio BP

Sarasquete et al, .Blood 2008 112: 2709-2712

TIPOS DE ARRAYS

- Análisis de Expresión : *Transcriptoma*

 - Microarrays de cDNA y de oligonucleótidos**

 - Otros: Splicing alternativo, exónicos, miRNAs*

- Análisis Genómicos:

 - Arrays de CGH y SNPs*

- Análisis Epigenéticos:

 - Arrays de Metilación y Chip-on-chip*

Microarrays: Análisis Epigenéticos:

- *Arrays de Metilación:*

La metilación del ADN es el evento epigenético mejor conocido

Importante mecanismo de regulación génica.

Afecta a muchas neoplasias se asocia a pérdida de función génica

- *Chip-on-chip* (Chromatine immunoprecipitation on chip).

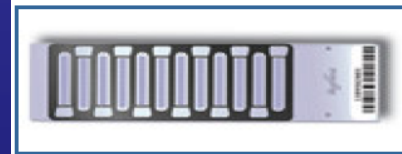
Modificación de Histonas

Factores de transcripción

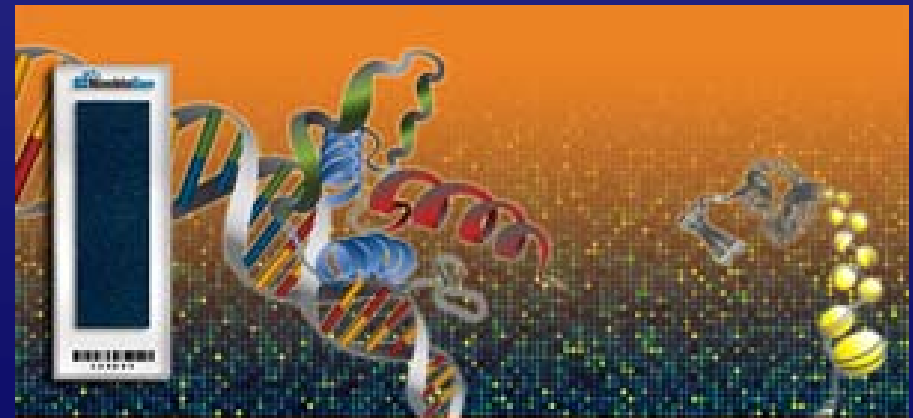
Golden Gate Methylation (Illumina)



- 1505 CpGs
- Correspondientes a 807 genes
- 96 muestras simultaneamente



- 27.578 CpGs
- 14000 genes
- 12 muestras simultaneamente



Chromatin Immunoprecipitation-on-chip

Técnicas Moleculares: Microarrays

Experimentos con microarrays

Diseño:

Hipótesis , Cuestiones que nos debemos plantear y cómo resolverlas,
Número de muestras a estudiar etc..

Fuentes de variabilidad:

Muestra: Tumoral o normal, Pureza de la muestra, heterogeneidad biológica,.

Aspectos metodológicos: Extracción ARN, ADN, amplificación hibridación, scanning etc..

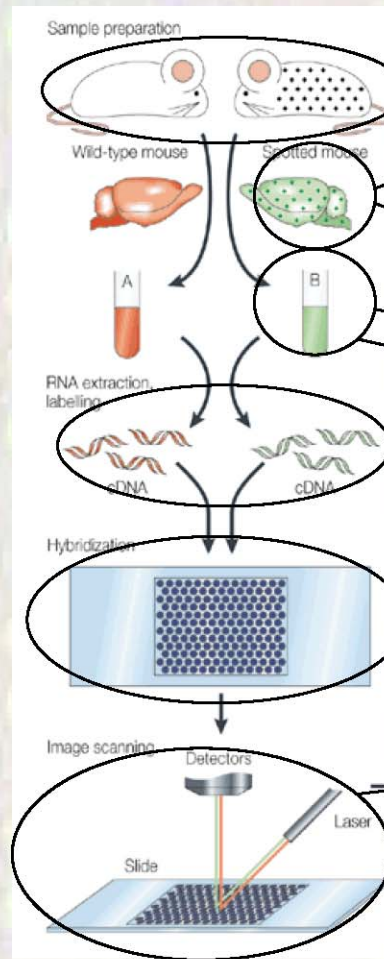
Limitaciones:

Número de muestra a analizar, económicas (precio de los arrays) **etc..**

Análisis de los datos:

“Software” para microarray

Fuentes de variabilidad



- Biological Heterogeneity in Population.
- Specimen Collection/ Handling Effects.
 - Tumor: surgical bx, FNA.
 - Cell Line: culture condition, confluence level.
- Biological Heterogeneity in Specimen.
- RNA extraction.
- RNA amplification.
- Fluor labeling.
- Hybridization.
- Scanning.
 - PMT voltage.
 - laser power.

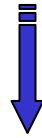
(Geschwind, *Nature Reviews Neuroscience*, 2001)

Características de la muestra

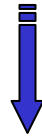
Tumores primarios: **células tumorales** + otras poblaciones celulares



Purificación: “sorting”



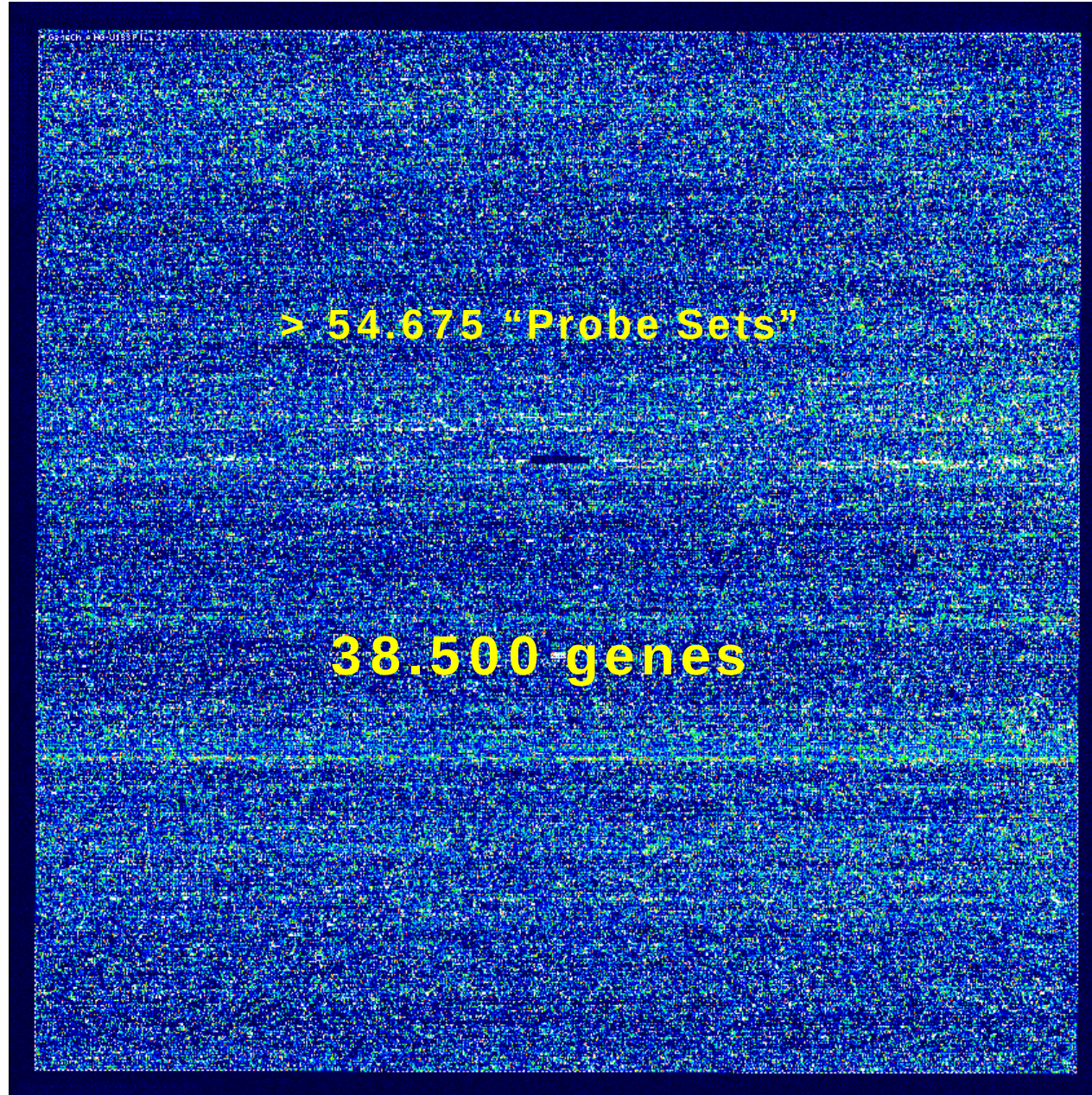
¿Puede distorsionar el perfil de expresión génica?



Parece que no.

75% de pureza $\simeq$ 100%

Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)



Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana RExcel ?

Escriba una pregunta

100% ? SAM SAM Plot Control

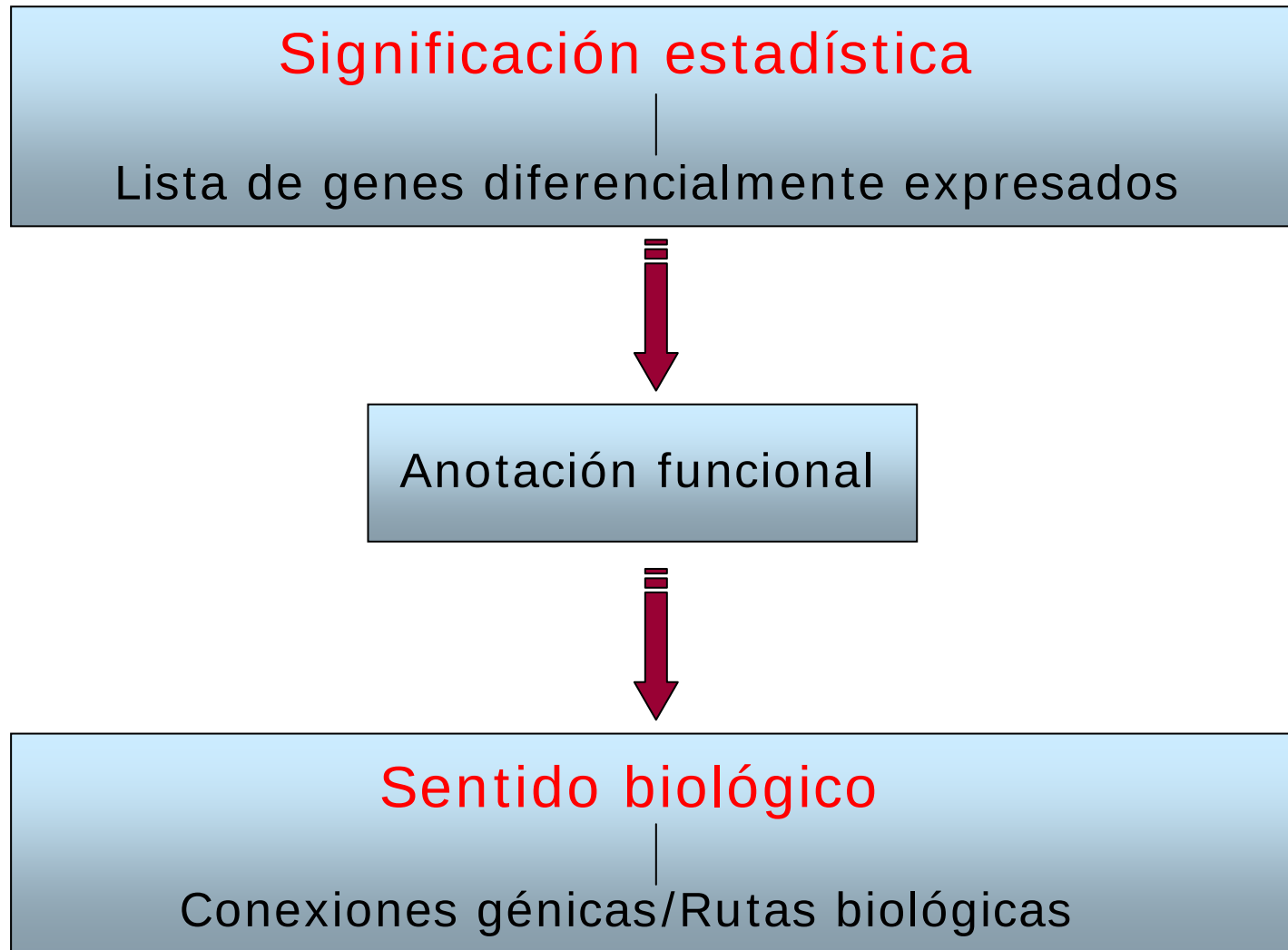
Responder con cambios... Terminar revisión...

Arial 9 N K S

K25 3647.8

	A	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Probe Set	NBL003	NBL004	NBL005	NBL006	NBL531	NBL533	NBL534	CLL525	CLL528	CLL529	CLL532
2	1007_s_at	283.4	205.3	149.8	187.3	229.3	162	185.8	223.4	152.5	116.2	156.5
3	1053_at	16.4	20.9	6.8	62.2	16.9	72.3	41.9	23.6	5.5	29.5	4.6
4	117_at	134.9	27.7	13.7	37.2	62.3	13.6	30.6	51.4	8.5	39.5	7.1
5	121_at	712.7	514.9	362.5	131.2	201	96.9	123	200.5	147	187.7	127
6	1255_g_at	55.9	46.2	8.4	3.2	42	12.9	32.3	8.4	15.6	26.5	4.5
7	1294_at	221.8	451.5	124.6	434.5	586.6	383.1	521.3	216.9	334.7	315.9	168.3
8	1316_at	130.8	65.8	49.4	35.4	34.8	44.3	35.4	66.7	79.6	58.4	31
9	1320_at	11.8	31.5	9.8	15.8	16.7	17.1	4	12.5	4	5.3	9.7
10	1405_i_at	18.7	3.9	15.9	26.2	10.1	22.8	32.9	4.3	7.6	4.6	2.8
11	1431_at	96.8	59.5	31.2	17.4	31.5	24.6	13.5	25.6	15.4	31.7	11.8
12	1438_at	59.6	47.7	38.9	3	31.8	19.7	4.1	16.3	2.3	9.2	11.8
13	1487_at	136.9	120.6	66.8	78.1	80.7	119.6	112.5	70.2	68.8	64.6	79
14	1494_f_at	180.5	117.2	94	40.4	104.6	65.6	71.5	76.1	65.2	103.6	50.3
15	1598_g_at	392.8	564.6	225.1	46.2	164.3	64.3	78.5	162.1	52.2	69.2	58.9
16	160020_at	526.3	372.2	205.9	34	149.6	70.1	94.1	144.7	69.8	112	68.5
17	1729_at	208.4	218.7	132.8	181.6	208	196.2	235.2	118.3	159.8	140.1	100.1
18	177_at	55.3	37.7	8.4	11.8	60.4	17.1	7	38.6	28.4	28.9	26.5
19	1773_at	29.9	58.2	19.7	22.1	15.3	5	21.2	34.2	55.8	41.2	26.6
20	179_at	317.2	267.4	134.7	74.8	169.2	115.4	104.7	208.5	79.3	129.5	92.4
21	1861_at	41.9	68.5	44.8	42	47.2	9.4	41.1	17.9	22.6	27.1	28.4
22	200000_s_at	8.7	239.8	12.2	347.1	514.6	496.2	410.8	405.1	423.5	332.3	408.2
23	200001_at	70	110.7	27.7	155.2	73.1	132.6	110.6	53.2	117.6	107.6	153.8
24	200002_at	343.7	1802.4	3090.5	2842.8	4094	3703.6	3256.8	3478	3213.3	2826.6	2646.7
25	200003_s_at	359.4	3497.1	2284.5	5178	9932.9	6550.4	5875	3647.8	4479	3404.5	2484.7
26	200004_at	721.2	1781.2	3505.3	3049.1	2003.7	2189.5	2675.2	2220.6	2417.4	2370.2	2812.4
27	200005_at	80.5	741.2	285.7	898.5	622.7	854.5	810.9	472.1	526.9	517.6	610
28	200006_at	469.6	806.9	1687.6	1507.2	1544.5	1409.7	1483.7	1567.5	1937.4	1564.2	1963.3
29	200007_at	541.2	711.2	1570.1	1460.7	1431.9	1528.7	1954.2	1429.1	1658.3	1593.4	1182.5
30	200008_s_at	129.2	176.3	110	220.1	184.2	108.5	144.1	152.4	159.5	222.8	163.7
31	200009_at	438.8	1167.8	1057.7	1665.4	2142.2	2245.1	2177.3	2539.8	1696	1973.9	2727.5
32	200010_at	478.9	1126	2850.1	1939.4	2644.7	1807.8	2533.4	948.6	1050.3	1207.9	1010.7
33	200011_s_at	86.3	201.6	205.6	188.7	173	171.6	109.6	169.9	160.1	132.9	201.6
34	200012_x_at	1805.1	4522	5968.7	6078.6	10055.2	7470.4	5995.8	7180.1	5847	6620.3	5985.5
35	200013_at	237.1	786.2	1062.8	2488.8	3409.8	1803.5	1997.1	1857.4	2000.6	1768.8	1712.5

¿Qué hacer con miles-millones de datos?



Miles de datos (genes) para relativamente pocas muestras

Análisis no supervisado

Descubrimiento de clases

No información “a priori”

“Clustering” jerárquico

Cluster/TreeView

“Multidimensional scaling”

BRB array tool



Análisis supervisado

Predicción de clases

Información de las clases

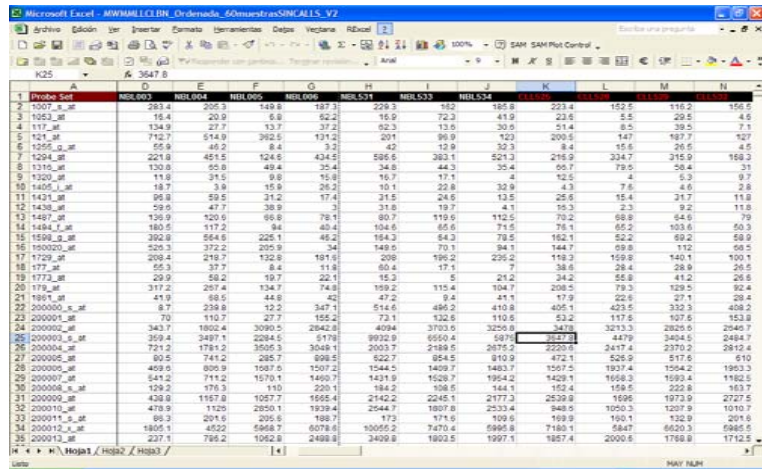
“Significant Analysis of microarrays”
(SAM)

“Prediction Analysis of microarrays”
(PAM)

“Weighted voting algorithm-LOOCV”
(GeneCluster)

“Support Vector Machine”
(SVM)

Análisis no supervisado



Microsoft Excel - MWMML1.CLIN_Ordenada_50muestrasSINCA115_V7

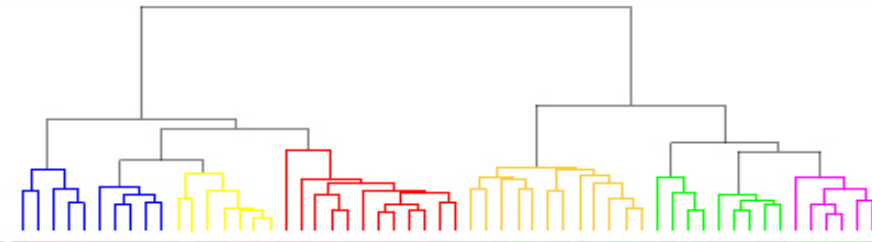
3647.8

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Probe Set	MEIL003	MEIL004	MEIL005	MEIL531	MEIL533	MEIL534	MEIL535	MEIL536	MEIL537	MEIL538	MEIL539	MEIL540	MEIL541
2	12007_s_at	283.4	205.9	149.8	187.3	229.3	192	185.8	223.4	152.5	115.2	155.5	155.5	155.5
3	10523_s_at	15.4	20.9	15.8	52.2	15.9	72.3	41.9	22.5	5.5	29.5	4.5	4.5	4.5
4	1117_s_at	134.9	27.7	13.7	37.2	52.3	13.5	30.5	11.4	8.5	39.5	7.1	7.1	7.1
5	121_s_at	712.7	514.9	262.5	131.2	201	99.9	123	200.5	147	187.7	127	127	127
6	1255_s_at	55.9	45.2	8.4	3.3	42	13.9	32.3	8.4	15.5	25.5	4.5	4.5	4.5
7	1294_s_at	221.8	451.5	124.5	434.5	585.5	383.1	521.3	215.9	334.7	315.9	158.3	158.3	158.3
8	1315_s_at	130.5	55.8	49.4	35.4	34.8	44.3	35.4	55.7	79.5	58.4	31	31	31
9	1320_s_at	11.9	31.5	9.9	15.8	16.7	17.1	4	12.5	4	5.3	9.7	9.7	9.7
10	1405_s_at	18.7	3.9	15.9	25.2	10.1	22.8	32.9	4.3	7.8	4.6	2.8	2.8	2.8
11	1421_s_at	95.9	39.5	31.2	17.4	21.5	24.5	13.5	25.5	15.4	21.7	11.8	11.8	11.8
12	1435_s_at	59.9	47.7	39.8	5	31.8	19.7	4.1	15.3	5.3	9.2	11.8	11.8	11.8
13	1457_s_at	126.9	120.9	66.8	78.1	80.7	119.5	70.2	68.8	64.9	64.9	79	79	79
14	1484_s_at	185.5	117.2	84	82.4	104.8	85.6	75.5	75.1	65.2	103.8	80.3	80.3	80.3
15	1508_s_at	362.8	554.6	225.1	45.2	164.3	84.3	78.5	162.1	52.2	69.2	58.9	58.9	58.9
16	15020_s_at	526.3	372.2	205.9	34	149.5	70.1	84.1	144.7	69.8	112	68.5	68.5	68.5
17	1729_s_at	205.4	216.7	122.9	191.5	205	196.2	255.2	118.2	158.8	140.1	100.1	100.1	100.1
18	177_s_at	55.3	37.7	8.4	11.8	60.4	17.1	7	38.8	28.4	28.9	26.5	26.5	26.5
19	1772_s_at	29.9	58.2	19.7	22.1	15.3	5	21.2	34.2	55.8	41.2	25.5	25.5	25.5
20	178_s_at	317.2	207.4	134.7	74.8	189.2	115.4	104.7	205.5	73.3	129.5	52.4	52.4	52.4
21	1801_s_at	41.9	68.5	44.8	42	47.2	9.4	41.1	17.9	22.6	27.1	28.4	28.4	28.4
22	20000_s_at	8.7	238.8	12.2	347.1	514.6	496.2	410.8	405.1	423.5	332.3	408.2	408.2	408.2
23	200001_s_at	70	110	27.7	155.2	72.1	132.5	110.5	51.2	117.5	107.5	153.8	153.8	153.8
24	200002_s_at	343.7	1802.4	3090.5	2842.8	4094	3703.5	3259.8	3478	3213.3	2825.5	2549.7	2549.7	2549.7
25	200003_s_at	359.4	2497.1	2284.5	17178	8932.9	6550.4	5871	2229.8	4479	3454.5	2444.7	2444.7	2444.7
26	200004_s_at	721.2	1781.2	3505.3	3048.1	2003.7	2189.5	2675.2	2417.4	2370.2	2812.4	2812.4	2812.4	2812.4
27	200005_s_at	80.5	741.2	285.7	898.5	522.7	854.5	910.9	472.1	526.9	517.6	510	510	510
28	200006_s_at	405.9	605.9	1087.5	1507.2	1244.5	1408.7	1403.7	1507.5	1937.4	1554.2	1953.3	1953.3	1953.3
29	200007_s_at	541.2	711.2	1570.1	1460.7	1431.9	1529.7	1954.2	1429.1	1658.3	1989.4	1182.5	1182.5	1182.5
30	200008_s_at	129.2	175.3	110	220.1	184.2	508.5	144.1	152.4	158.5	222.8	183.7	183.7	183.7
31	200009_s_at	428.8	1167.8	1057.7	1555.4	2142.2	2245.1	2177.3	2529.8	1595	1073.9	2727.5	2727.5	2727.5
32	200010_s_at	478.9	1125	2850.1	1839.4	2544.7	1807.8	2533.4	848.5	1050.3	1207.9	1010.7	1010.7	1010.7
33	200011_s_at	65.3	201.5	295.8	198.7	173	174.9	109.6	189.9	160.1	132.9	201.8	201.8	201.8
34	200012_s_at	1805.1	4532	5868.7	6078.6	10055.2	7470.4	5985.8	7180.1	5847	6620.3	5985.5	5985.5	5985.5
35	200013_s_at	227.1	765.2	1052.8	2498.8	2409.8	1803.5	1997.1	1857.4	2000.5	1788.8	1712.5	1712.5	1712.5

⇒

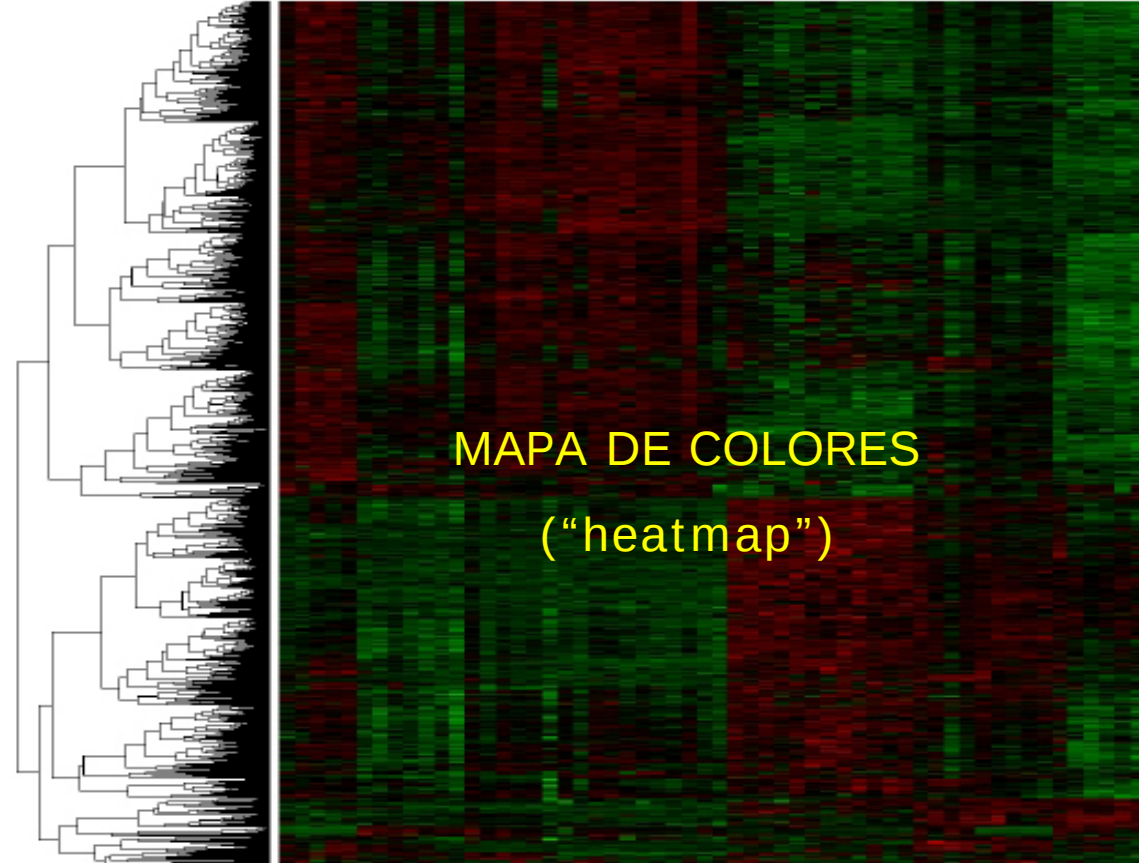
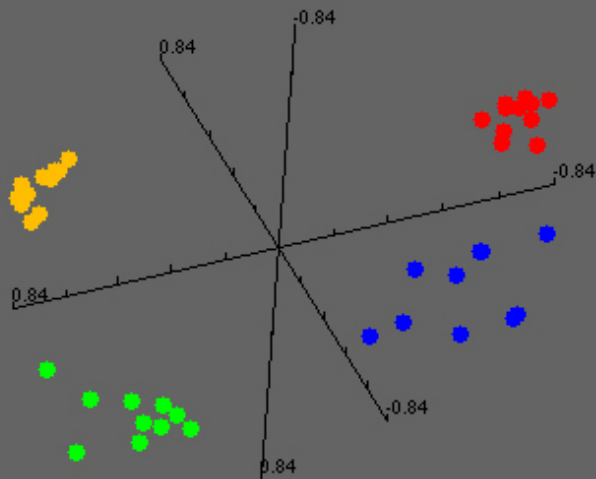
Dendrogramas

Análisis de “clustering”
jerárquico



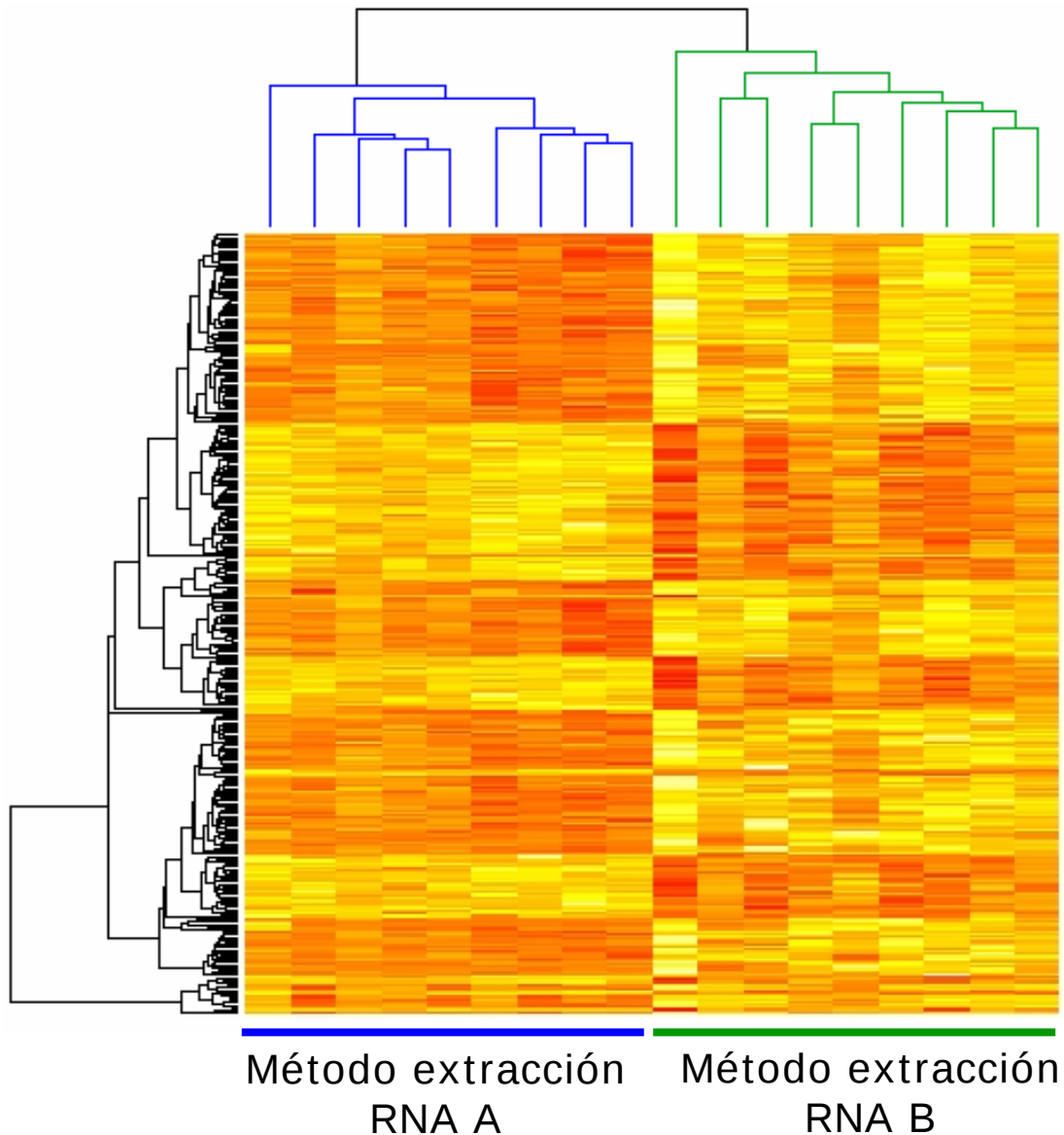
⇓

Análisis de componentes
principales (PCA)

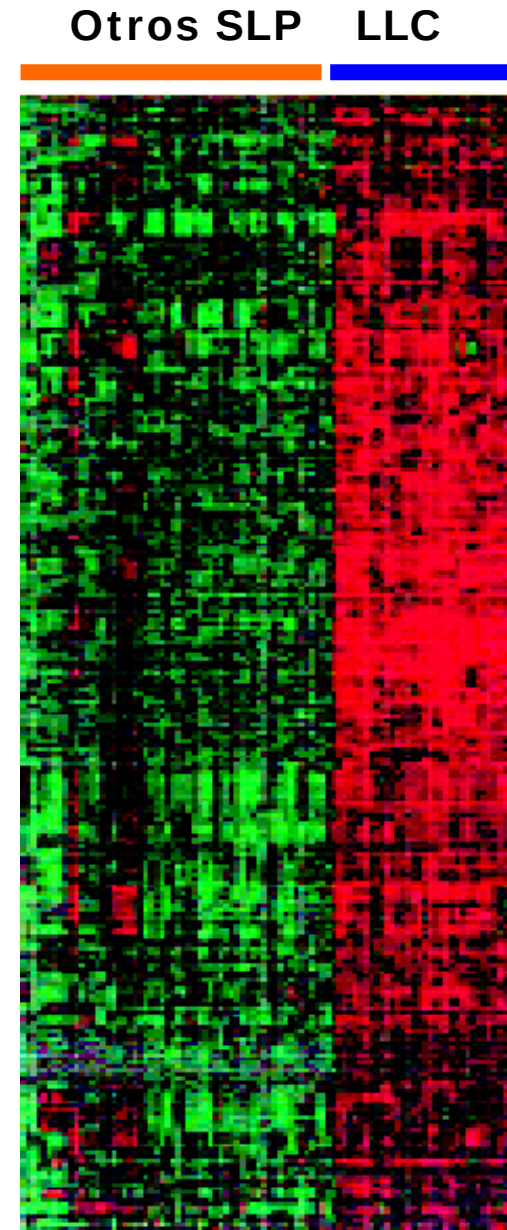


■ Alto nivel de expresión ■ Bajo nivel de expresión

Con un número suficiente de genes casi siempre es posible “clusterizar”



El análisis de “clustering” no refleja una supuesta estructura

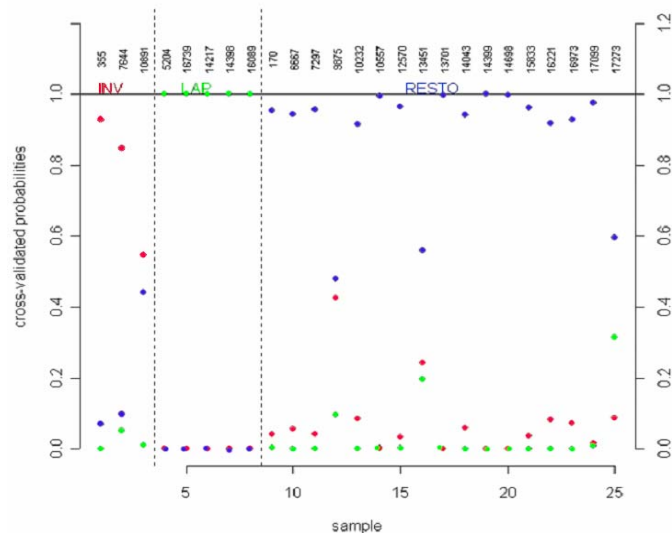


Análisis supervisados

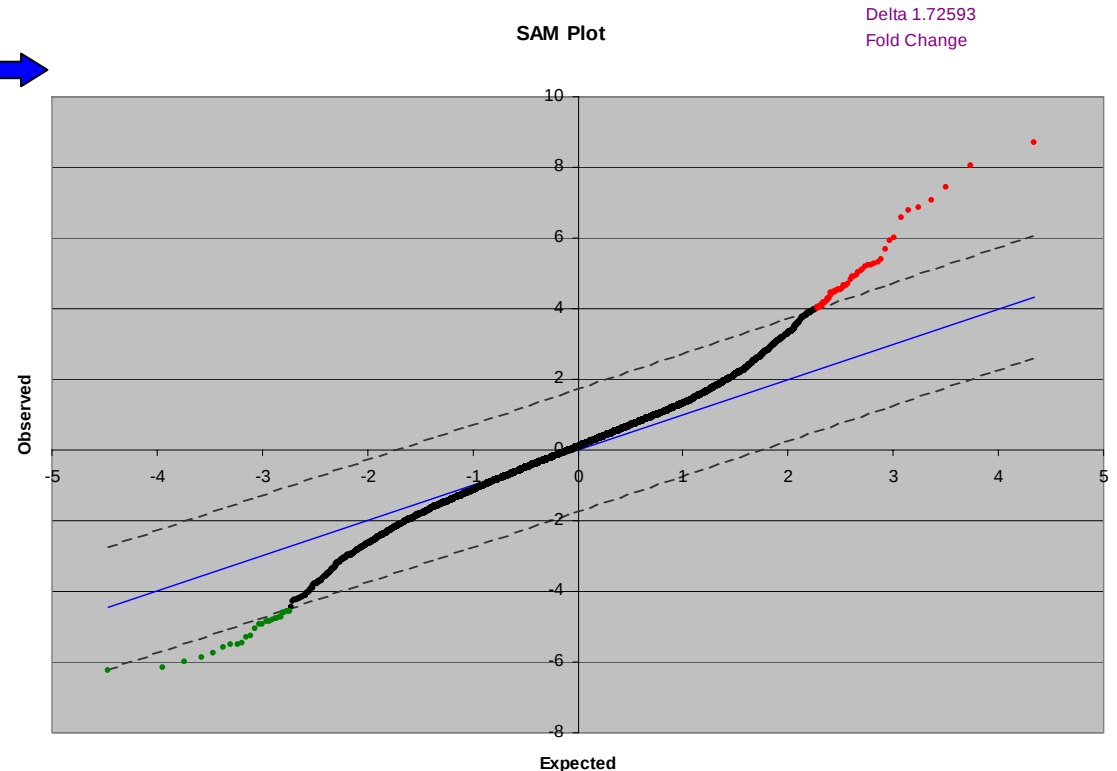
Microsoft Excel - MWMMMLC3IN_Ordensado_66monstrandoSINCA1.5_V2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Probe Set	NEIL003	NEIL004	NEIL005	NEIL006	NEIL007	NEIL008	NEIL009	NEIL010	NEIL011	NEIL012	NEIL013	NEIL014	NEIL015
2	1007_a_at	263.4	205.3	149.8	187.3	228.3	162	185.8	223.4	152.5	116.2	156.5		
3	1053_at	15.4	20.9	5.8	52.2	72.3	41.9	22.5	5.5	29.5	4.5			
4	117_at	134.9	27.7	13.7	37.2	92.3	13.5	30.5	51.4	8.5	38.5	7.1		
5	121_at	712.7	514.9	362.5	131.2	201	96.9	123	200.5	147	187.7	127		
6	1255_a_at	55.8	46.2	8.4	3.2	42	12.9	52.3	8.4	15.5	26.5	4.5		
7	1294_at	221.8	451.5	124.5	434.5	585.6	383.1	521.3	215.9	334.7	315.9	158.3		
8	1315_at	130.8	55.8	49.4	35.4	34.8	44.3	35.4	55.7	79.5	58.4	31		
9	1320_at	11.5	31.5	9.8	15.8	16.7	17.1	4	12.5	4	5.3	9.7		
10	1405_a_at	18.7	3.9	15.9	26.2	10.1	22.8	32.9	4.3	7.5	4.6	2.8		
11	1421_at	95.8	59.5	21.2	17.4	21.5	24.5	13.5	25.5	15.4	21.7	11.8		
12	1435_at	59.5	47.7	38.9	3.2	31.8	19.7	4.1	15.3	2.3	9.2	11.5		
13	1487_at	136.9	120.5	98.8	78.1	80.7	119.5	112.5	70.2	68.8	54.5	79		
14	1484_a_at	180.5	117.2	94	48.4	184.5	85.5	71.5	76.1	65.2	103.6	50.3		
15	1509_a_at	392.8	554.5	225.1	45.2	164.3	54.3	79.5	152.1	52.2	69.2	58.9		
16	15020_at	525.3	272.2	205.9	14	148.5	70.1	84.1	144.7	99.8	112	56.5		
17	1729_at	288.4	218.7	132.8	191.5	205	195.2	225.2	118.3	158.8	140.1	100.1		
18	177_at	55.3	37.7	8.4	11.8	80.4	17.1	7	38.4	28.4	28.9	25.5		
19	1773_at	22.9	58.2	19.7	22.1	15.2	5	21.2	34.2	55.8	41.2	25.5		
20	179_at	317.2	287.4	134.7	74.8	189.2	115.4	104.7	208.5	79.3	128.5	82.4		
21	1861_at	41.9	88.5	44.8	42	47.2	9.4	41.1	17.9	22.5	27.1	28.4		
22	200000_a_at	8.7	238.9	12.2	34.7	514.4	486.2	410.8	405.1	423.5	332.3	358.2		
23	200001_at	70	110.7	27.7	155.2	73.1	132.5	110.5	53.2	117.5	107.5	153.8		
24	200002_at	343.7	1802.4	3080.5	2842.8	4094	3703.5	3250.8	3478	3213.3	2825.5	2546.7		
25	200003_at	369.4	3497.1	2284.5	5718	8932.8	6550.4	5978	2227.1	4479	3404.5	2484.7		
26	200004_at	721.2	1781.2	3505.3	3048.1	2003.7	2188.5	2875.2	2229.1	2417.4	2370.2	2812.4		
27	200005_at	80.5	741.2	285.7	898.5	522.7	854.5	910.9	472.1	525.9	517.5	510		
28	200006_at	459.5	806.9	1067.5	1207.2	1544.5	1469.7	1463.7	1507.5	1937.4	1554.2	1953.3		
29	200007_at	541.2	711.2	1570.1	1460.7	1431.9	1528.7	1954.2	1429.1	1658.3	1693.4	1182.5		
30	200008_a_at	129.2	175.3	110	220.1	164.2	158.5	144.1	152.4	158.5	222.8	153.7		
31	200009_at	438.8	1167.8	1057.7	1655.4	2142.2	2245.1	2177.3	2538.8	1696	1973.9	2727.5		
32	200010_at	478.9	1125	2850.1	1939.4	2544.7	1807.8	2533.4	948.5	1050.3	1207.9	1010.7		
33	200011_at	86.3	201.5	205.5	188.7	172	171.5	109.5	159.9	150.1	132.9	201.5		
34	200012_at	1805.1	4532	5868.7	6078.5	10055.2	7470.4	5940.8	7180.1	5847	6620.3	5885.5		
35	200013_at	237.1	785.2	1062.8	2498.8	3409.8	1802.5	1997.1	1857.4	2000.5	1768.8	1712.5		

...y validarlas



Encontrar diferencias significativas en la expresión...

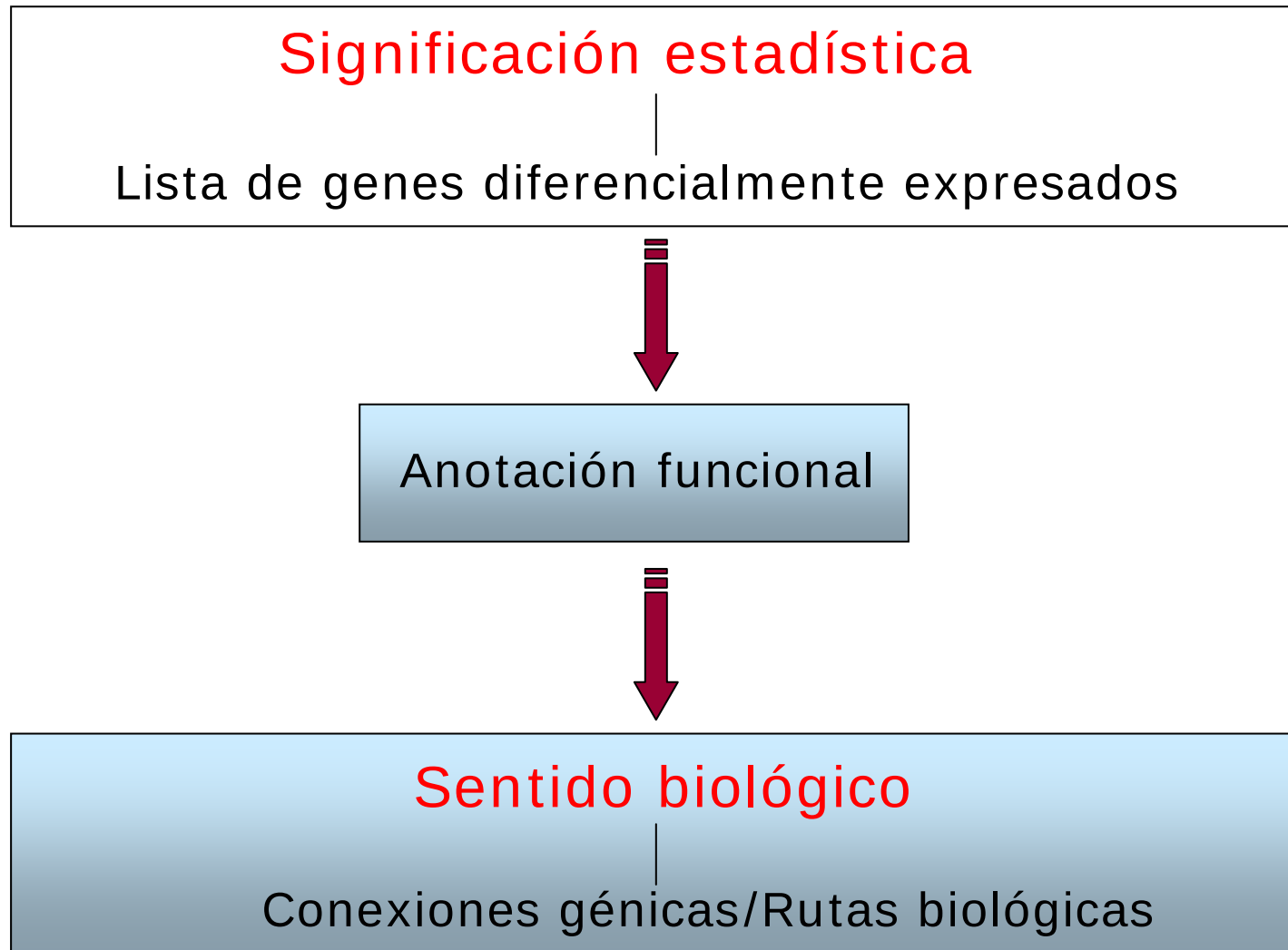


“Significant Analysis of microarrays” (SAM)

“Prediction Analysis of microarrays” (PAM)

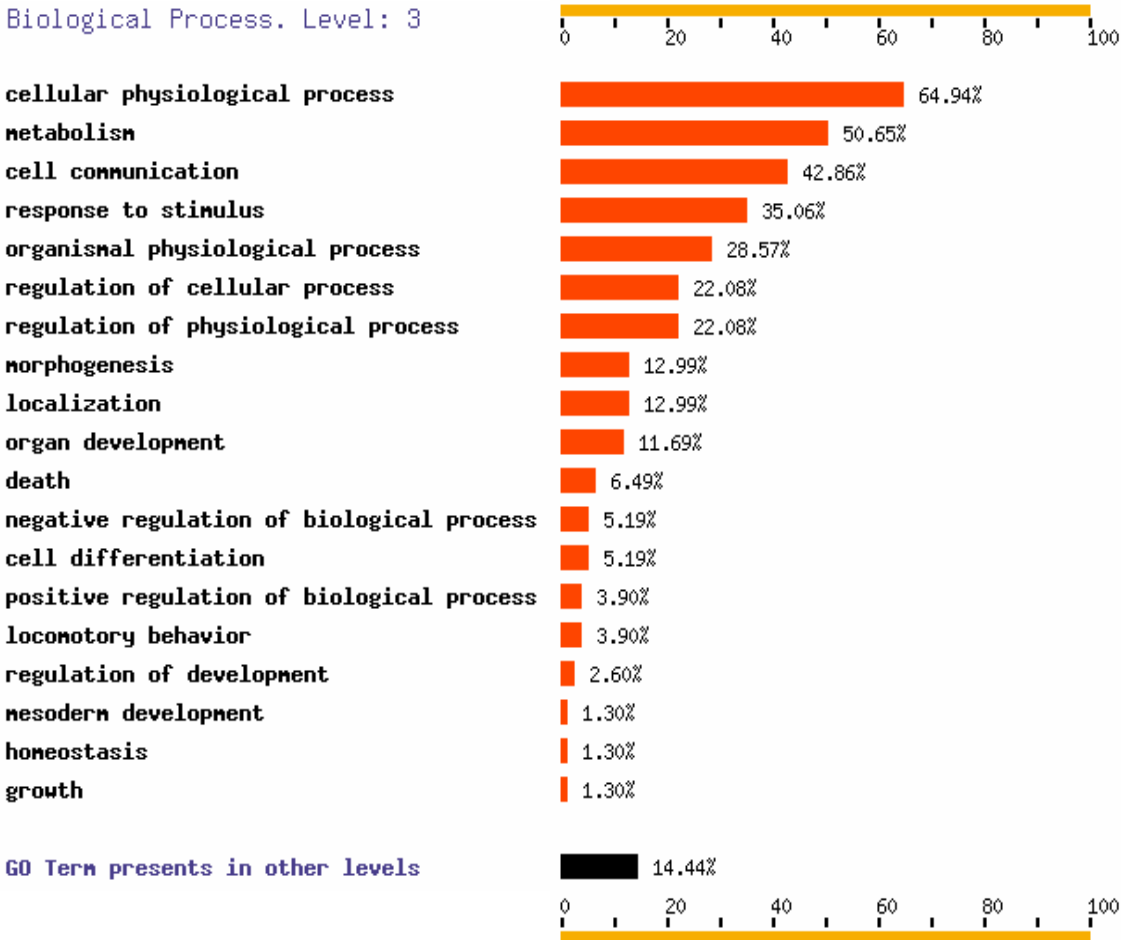
Grupo “training” y grupo test

¿Qué hacer con miles-millones de datos?



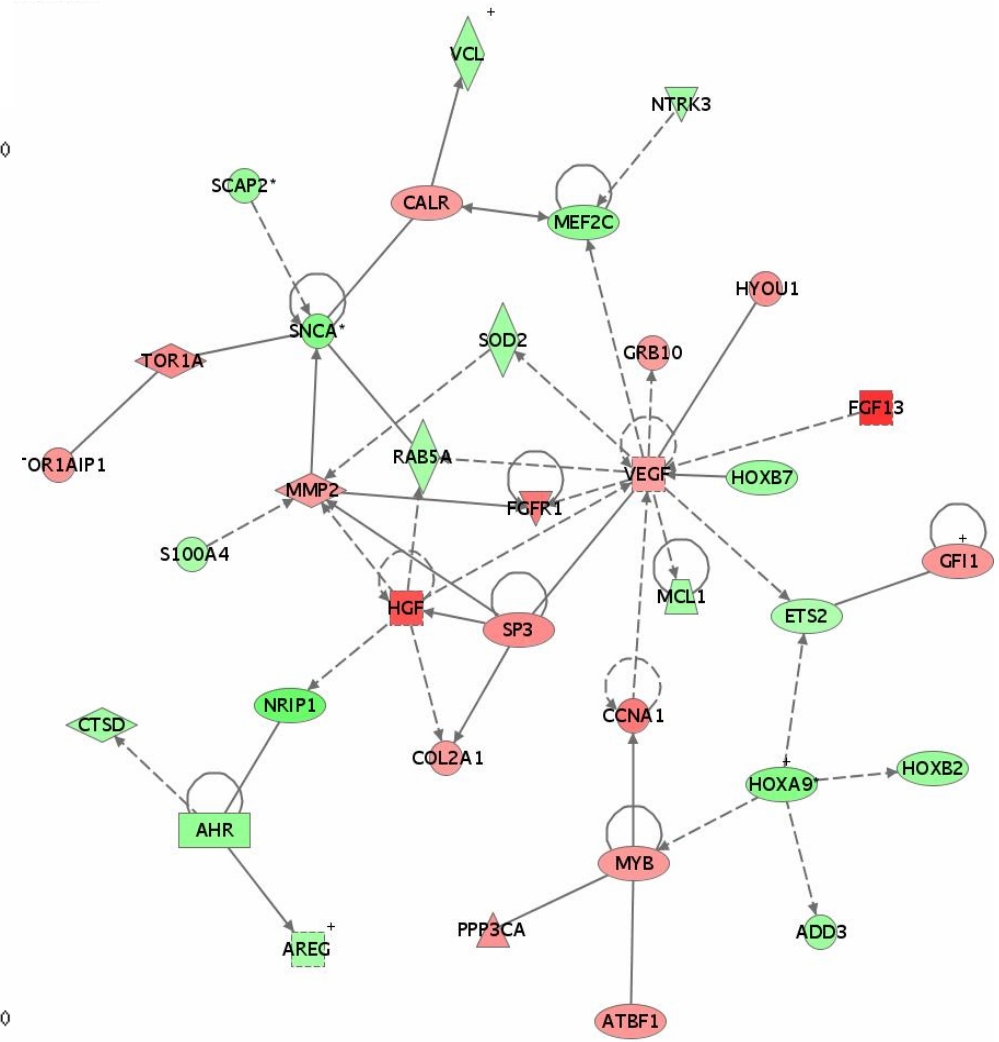
Anotación Funcional

Bases públicas de datos: GenBank,
Gene Ontology, KEGG, GeneCards



FatiGO (Babelomics)

Rutas y sistemas biológicos



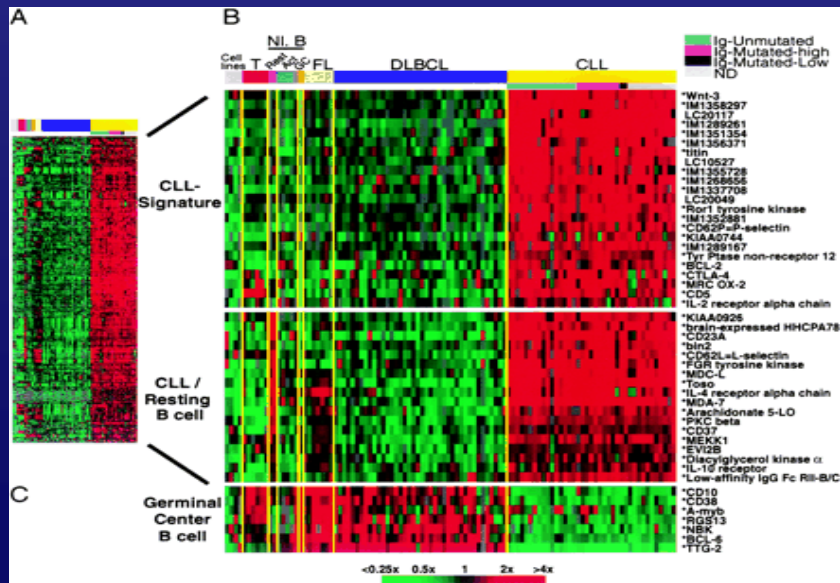
Ingenuity Pathways Analysis

Estudios Genómicos masivos

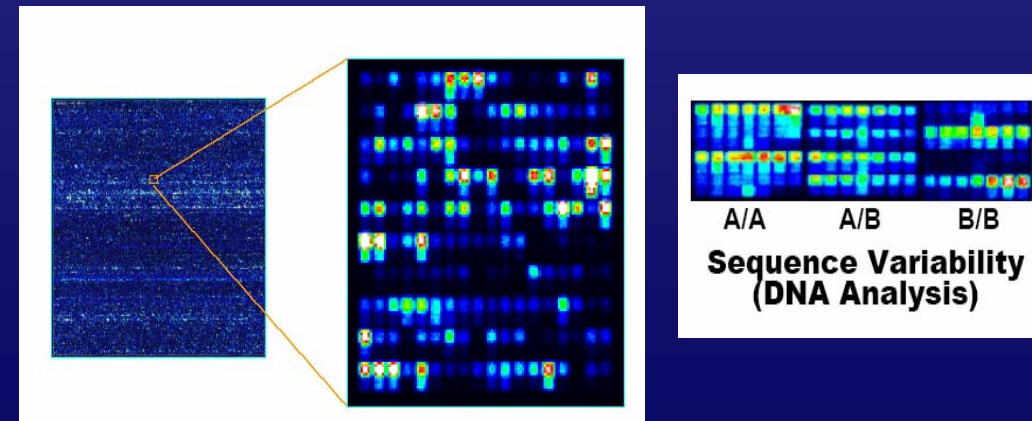
Metodología

- Perfiles de expresión génica (Arrays de RNA)
- CGH-arrays
- Arrays de SNP de alta densidad :

Nº copias de ADN, pérdida de heterogocisidad (LOH) y disomía uniparental (DUP)



AFFYMETRIX GENE CHIP MAPPING 500K

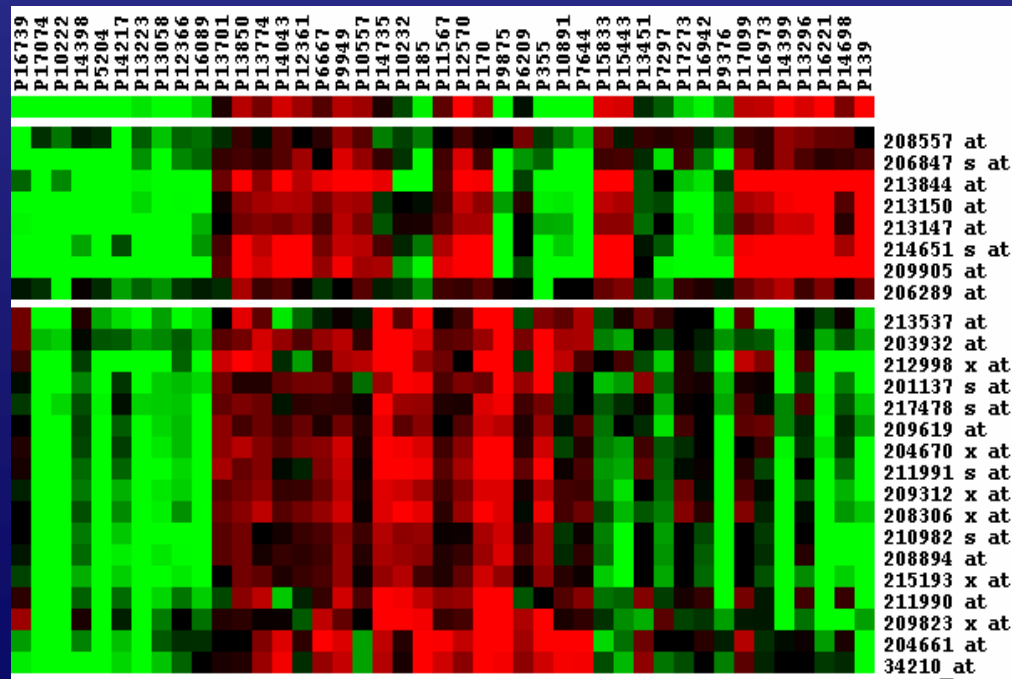
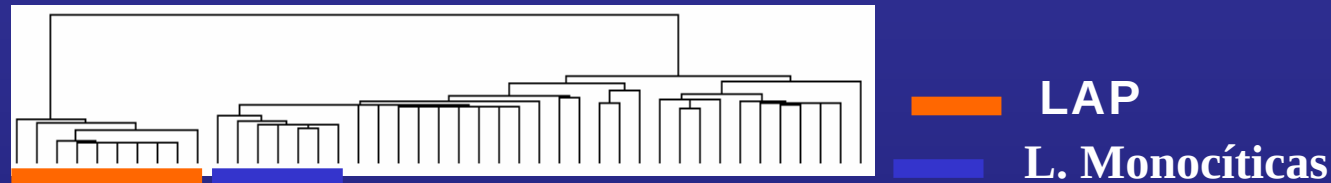


Clasificación de la LMA según su expresión génica.

Deregulación de genes según el subtipo de LMA.

LAM

Gutiérrez et al, Leukemia, 2005; 19:402-09.



*Estudios costosos,
laboriosos y de difícil uso
rutinario.*

Técnicas Moleculares: Microarrays

Experimentos con microarrays

Diseño:

Hipótesis , Cuestiones que nos debemos plantear y cómo resolverlas, Número de muestras a estudiar etc..

Fuentes de variabilidad:

Muestra: Tumoral o normal, Pureza de la muestra, heterogeneidad biológica,.

Aspectos metodológicos: Extracción ARN, ADN, amplificación hibridación, scanning etc..

Limitaciones:

Número de muestra a analizar, económicas (precio de los arrays) **etc..**

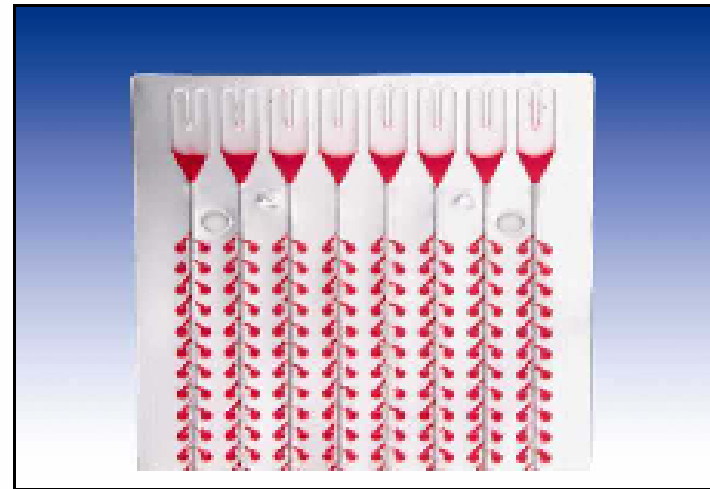
Análisis de los datos:

“Software” para microarray

Estudios costosos, laboriosos y de difícil uso rutinario.

LMA: Expresión Génica/Traslocaciones por Q-PCR.

Diseño y desarrollo de tarjetas diagnósticas y pronósticas.



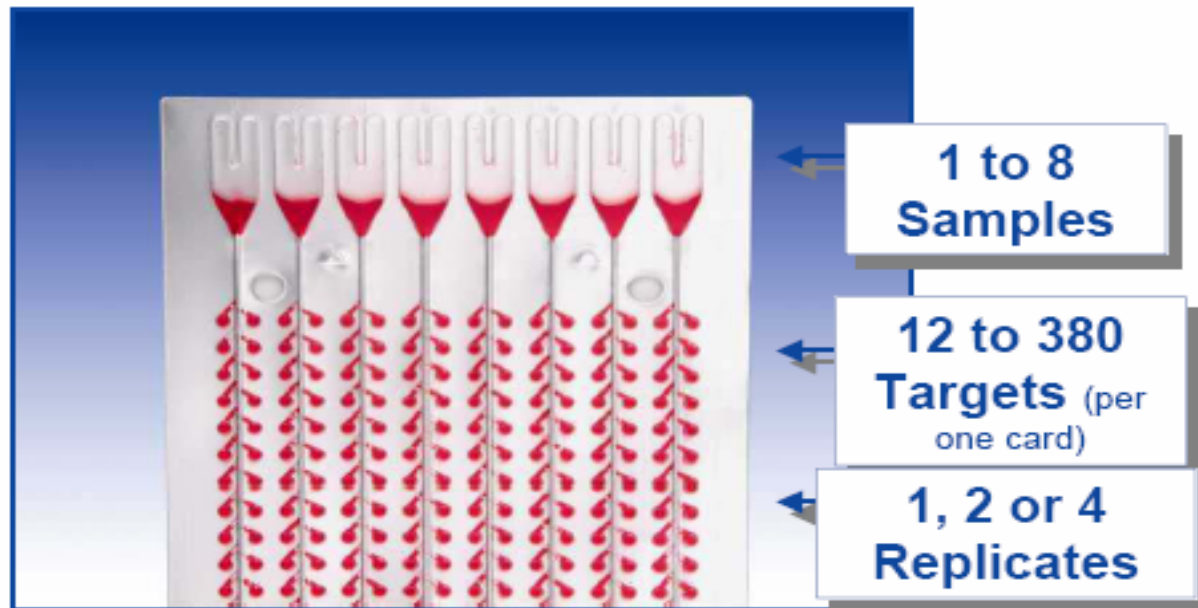
Tarjetas: TaqMan Low Density Array.

LMA: Expresión Génica/Traslocaciones por Q-PCR.

TaqMan® Low Density Array

Micro Fluidic Channels

TaqMan® Assays-on-Demand Gene Expression Products also available in small volume format



384 spots

LMA: Expresión Génica/Traslocaciones por Q-PCR.

