



TESE DE DOUTORAMENTO

**ACCIÓN ESTRATÉGICA PARA LA
POLIQUISTOSIS RENAL (PQR): DESARROLLO
DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS Y SU
APLICACIÓN EN LA POBLACIÓN GALLEGA
COMO MODELO EXPORTABLE A OTRAS
COMUNIDADES AUTÓNOMAS**

María Lara Besada Cerecedo

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA
MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2019





DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

ACCIÓN ESTRATÉGICA PARA LA POLIQUISTOSIS RENAL (PQR): DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA POBLACIÓN GALLEGA COMO MODELO EXPORTABLE A OTRAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS

Dna. María Lara Besada Cerecedo

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 11 de Outubro de 2019

Asdo. María Lara Besada Cerecedo





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/ TITOR DA TESE

ACCIÓN ESTRATÉGICA PARA LA POLIQUISTOSIS RENAL (PQR): DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA POBLACIÓN GALLEGA COMO MODELO EXPORTABLE A OTRAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS

D. Miguel A. García González
D. Ángel María Carracedo Álvarez

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. María Lara Besada Cerecedo, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 11 de Outubro de 2019

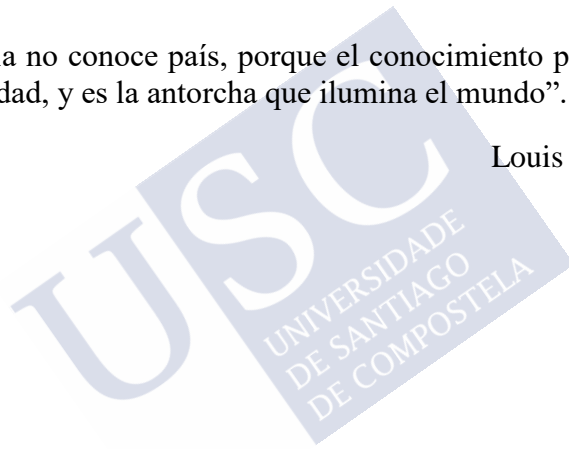
Asdo. M.A. García González
(director)

Asdo. Á. M^a Carracedo Álvarez
(titor)



“La ciencia no conoce país, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina el mundo”.

Louis Pasteur





AGRADECIMIENTOS

No quiero cerrar este capítulo sin plasmar mi agradecimiento hacia aquellas personas que de una forma u otra han participado en la realización de este proyecto.

Muchas gracias,

Al **Dr. Miguel Ángel García González**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo. Gracias por su apoyo y ayuda, porque sin él yo no estaría hoy escribiendo esto.

Al **Prof. Dr. Ángel Carracedo**, por su apoyo constante al grupo y por mantenernos siempre abiertas las puertas de la fundación que él preside.

A **tod@s l@s compañer@s de laboratorio**, por su colaboración y aportaciones.

A los miembros de la "Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica", que también participaron en este proyecto, sobre todo a la **Dra. Beatriz Sobrino** y al **Dr. Jorge Amigo Lechuga** por haberme facilitado el trabajo día tras día.

Y en especial a **mi familia, a mis padres, hermanos y tías**, por su apoyo incondicional.



Este Proyecto se llevó a cabo a cabo con las siguientes fuentes de financiación:

Proyecto de Promoción de Desarrollo Pre-comercial de Resultados de Investigación en Salud PRIS (Xunta de Galicia), 2014.

Proyecto de Investigación en Salud (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI15/1467), 2015

Axudas Grupo Potencial Crecemento, Xunta de Galicia, GAIN (IN607B 2016/020), 2017

Axudas Grupo Potencial Crecemento, Xunta de Galicia, GAIN (IN607B 2019/14), 2019

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis de doctoramiento.



ABREVIATURAS

aa:	aminoácidos
ADPKD:	Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Dominante (<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i>)
ADPLD:	Enfermedad Poliquística Hepática Autosómica Dominante (<i>Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease</i>)
ARPKD:	Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Recesiva (<i>Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease</i>)
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CHOP:	Complejo Hospitalario de Pontevedra
CHUAC:	Complejo Hospitalario Universitario A Coruña
CHUF:	Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol
CHUOU:	Complejo Hospitalario Universitario de Ourense
CHUS:	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago
CHUVI:	Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
DMSO:	Dimetilsufóxido
ADN:	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)

- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ESRD: Enfermedad renal crónica terminal (*End Stage Renal Disease*)
- GPS: Sitio proteolítico de un receptor acoplado a proteína G (*G-protein-coupled receptor proteolytic site*)
- H. Burela: Hospital de Burela
- H. Fátima: Hospital Nuestra Señora de Fátima
- H. Povisa: Hospital de Povisa
- HTA: Hipertensión arterial
- HULA: Hospital Universitario Lucus Augusti
- IGV: *Integrative genomics viewer*
- ISP: Partículas esféricas Ion (*Ion sphere particles*)
- KDa: KiloDalton
- LR: Largo rango (*Long range*)
- LRR: Repeticiones ricas en leucina (*Leucin-rich repeats*)
- MODY: Diabetes juvenil tipo adulto (*Maturity onset diabetes of the young*)
- Ng: nanogramos
- NGS: Secuenciación de Nueva Generación (*Next Generation Sequencing*)
- OMIM: *Online mendelian inheritance in man*
- PC1: Policistina 1 (*Polycystin 1*)

PC2:	Policistina 2 (<i>Polycystin 2</i>)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PGM:	Máquina del genoma personal (<i>Personal Genome machine</i>)
PKD:	Enfermedad poliquística renal (<i>Polycystic kidney disease</i>)
Pb:	pares de bases
PLAT:	<i>Polycystin-1, lipoxygenase, alpha-toxin</i>
REJ:	Receptor para <i>Egg Jelly</i>
RM:	Resonancia Magnética
SEN:	Sociedad Española de Nefrología
SNV:	Variantes de nucleótido único (<i>Single nucleotide variants</i>)
TC:	Tomografía Computerizada
TRP:	Receptores de potencial transitorio de canales iónicos (<i>Transient receptor potential</i>)
TRS:	Terapia renal sustitutiva
TVC:	<i>Torrent Variant Caller</i>
UTRs:	Regiones no traducidas (<i>Untranslated regions</i>)



ÍNDICE

RESUMEN	23
ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	27
1 Enfermedad Renal Quística Hereditaria	27
2 Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Dominante (ADPKD)	27
2.1 Genética de ADPKD	28
2.2 Proteínas ADPKD	31
3 Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Recesiva (ARPKD)	35
3.1 Genética de ARPKD	36
4 Cistogénesis y cilio primario	36
5 Formas atípicas de la Poliquistosis Renal:	38
6 Diagnóstico de ADPKD	40
6.1 Diagnóstico de ADPKD mediante técnicas de imagen	41
6.2 Diagnóstico genético de ADPKD:	42
6.3 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)	45
7 Pronóstico. Correlación fenotipo-genotipo en ADPKD	45
8 Principales manifestaciones extrarrenales en ADPKD	47
9 El tratamiento renal sustitutivo en ADPKD	50
10 Tratamiento de ADPKD	50
11 PROPKD Score	53

OBJETIVOS.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Selección de pacientes para el estudio	57
2. Extracción de ADN.....	57
3. Búsqueda bibliográfica	58
4. Secuenciación Tradicional por Método Sanger	58
4.1 Secuenciación tradicional por Método Sanger para el gen <i>PKDI</i>	60
5. Secuenciación mediante la tecnología NGS	61
5.1. Tecnología HaloPlex	62
5.1.1. Diseño de los paneles de genes mediante la tecnología HaloPlex	64
5.1.2. Preparación de librerías HaloPlex	65
5.2. Tecnología de amplicones para NGS	68
5.2.1. Preparación de librerías mediante la tecnología de amplicones para la región replicada (exones 1-34) del gen <i>PKDI</i>	68
5.2.2. Preparación de librerías mediante la tecnología de amplicones para los genes <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> y <i>GANAB</i>	76
5.3 Preparación del pool de librerías para la secuenciación mediante la plataforma de secuenciación Ion Torrent.....	86
5.4. Secuenciación mediante la plataforma Ion Torrent.....	88
5.5. Análisis de los datos de secuenciación.....	90
5.6. Filtrado de las variantes.....	91
6. Caracterización de las familias gallegas con ADPKD: Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (<i>FIS2016-2018</i>)”	92

7. Análisis estadístico para la correlación genotipo-fenotipo en el Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (FIS2016-2018)”	93
RESULTADOS. PARTE 1	95
Estrategias de diagnóstico para enfermedad quística renal hereditaria	95
1. Diagnóstico genético mediante paneles de genes utilizando la tecnología HaloPlex.	95
1.1. Diseño de los paneles y coberturas <i>in silico</i>	96
1.2. Construcción de las librerías	97
1.3. Secuenciación de las librerías e informe del <i>run</i> de secuenciación	99
1.4. Análisis de cobertura real de los paneles.....	104
1.4.1. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común de 8 genes.....	105
1.4.2. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común de 11 genes.....	106
1.4.3. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes	107
1.4.4. Análisis de cobertura para el gen PKD1 mediante la tecnología HaloPlex	110
2. Diagnóstico genético mediante la estrategia de amplicones ..	112
2.1. Generación de las librerías	113
2.2. Secuenciación de las librerías mediante la plataforma Ion Torrent e informe del <i>run</i> de secuenciación.....	115
2.3. Análisis de cobertura.....	121

3. Establecimiento de la estrategia de diagnóstico más adecuada para diagnosticar a una población PKD.	121
3.1. Análisis de variantes mediante la estrategia de diagnóstico 1 (paneles de genes haloplex + amplicones para la región replicada del gen <i>PKD1</i>)	122
3.2. Análisis de variantes mediante la estrategia de diagnóstico 2 (amplicones para los genes <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> y <i>GANAB</i> + paneles haloplex en caso negativo)..	137
4. Comparativa de los resultados de cobertura obtenidos mediante los paneles de genes, la estrategia de amplicones y exomas.	143
 RESULTADOS. PARTE 2	 145
 Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente.....	 145
1. Establecimiento del Registro Gallego de Enfermedad Poliquística (ReGEP)	145
2. Criterios de inclusión de los pacientes dentro del Proyecto...	149
3. Diagnóstico Genético.....	152
4. Información clínica y establecimiento de los estudios de correlación genotipo-fenotipo	174
 DISCUSIÓN	 191
1. Establecimiento de una estrategia de diagnóstico genético coste/efectiva para la enfermedad poliquística renal.	191
2. Aplicación de la estrategia de diagnóstico genético a una población cerrada como es la población gallega con poliquistosis renal.	195
 CONCLUSIONES	 199

BIBLIOGRAFÍA	205
ANEXOS	217
ANEXO 1	217
ANEXO 2	219
ANEXO 3	223
ANEXO 4	225
ANEXO 5	237
Índice Tablas	239
Índice Figuras	243





RESUMEN

La enfermedad poliquística renal (PKD, del inglés *Polycystic Kidney Disease*), comprende un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la formación bilateral de quistes renales que conducen a un estadio final de la enfermedad renal. Existen diferentes enfermedades mendelianas asociadas a esta patología, la enfermedad poliquística renal autosómica dominante (ADPKD, del inglés *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*), la enfermedad poliquística renal autosómica recesiva (ARPKD, del inglés *Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease*, ARPKD) y las formas atípicas de la enfermedad.

Hace años, el diagnóstico de estas enfermedades se hacía en base a parámetros clínicos, pero con el descubrimiento de los genes asociados a las patologías el diagnóstico genético empezó a adquirir relevancia como una forma de diagnóstico certero que permite anticiparse a la enfermedad y definir un posible pronóstico de la misma.

Las primeras herramientas de diagnóstico se basaban en la secuenciación tradicional por método Sanger, pero en los últimos años las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) revolucionaron el campo de la genética, superando los límites en cuanto a tiempo y coste impuestos por la secuenciación mediante método Sanger.

En este trabajo se desarrollan y se comparan herramientas de diagnóstico con el objetivo de establecer la estrategia más adecuada y eficiente para diagnosticar a una población de pacientes con enfermedad poliquística renal.

Además, se aplica dicha estrategia para diagnosticar a la población gallega poliquística y poder establecer el mapa genético gallego de la enfermedad poliquística renal autosómica dominante, al mismo tiempo que se genera un modelo de diagnóstico exportable a otras comunidades autónomas.



ABSTRACT

Polycystic Kidney Disease (PKD) comprises a heterogeneous group of disorders that are characterized by the bilateral formation of renal cysts that lead to end stage of renal disease. There are different Mendelian diseases associated with this pathology, autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) and the atypical forms of the disease.

Years ago, the diagnosis of these diseases was based on clinical parameters, but with the discovery of the genes associated with the pathologies, the genetic diagnosis began to gain relevance as a form of accurate diagnosis that allows anticipating and defining a possible prognosis of the disease.

The first diagnostic tools were based on traditional sequencing by the Sanger method, but in recent years, New Generation Sequencing (NGS) technologies revolutionized the field of genetics, exceeding time limits and cost imposed by Sanger sequencing.

In this project, diagnostic tools are developed and compared with the objective of establishing the most appropriate and efficient strategy to diagnose a population of patients with polycystic kidney disease.

In addition, this strategy is applied to diagnose the population of Galician polycystic and to establish the Galician genetic map of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease while generating a diagnostic model exportable to other autonomous communities.



INTRODUCCIÓN

1 Enfermedad Renal Quística Hereditaria

La enfermedad renal quística hereditaria comprende un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la formación bilateral de quistes renales y su progresiva expansión que conducen a un estadio final de enfermedad renal (ESRD, del inglés *End Stage Renal Disease*) (Lee *et al.*, 2011). Se caracteriza por la hiperproliferación de las células epiteliales tubulares, las alteraciones de las funciones secretoras y cambios en la deposición de la matriz extracelular y fibrosa, las cuales alteran profundamente la arquitectura del órgano y deterioran la función renal (Lee *et al.*, 2011).

Existen distintas enfermedades mendelianas asociadas a esta patología, la enfermedad poliquística renal autosómica dominante (ADPKD, del inglés *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*), la enfermedad poliquística renal autosómica recesiva (ARPKD, del inglés *Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease*, ARPKD) y las formas atípicas de la enfermedad, como nefronoptisis, Síndrome de Bardet-Biedl, Síndrome de Joubert, Síndrome de Meckel entre otros.

2 Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Dominante (ADPKD)

La enfermedad poliquística renal autosómica dominante (ADPKD) es la enfermedad renal hereditaria más común. La prevalencia de la enfermedad a día de hoy no está bien determinada y varía mucho de unos estudios a otros. Iglesias y

colaboradores (Iglesias *et al.*, 1983) estiman la prevalencia en 1 de cada 800-1000 individuos. Sin embargo, estudios más recientes estiman una prevalencia de ADPKD de 9.3 por cada 10.000 individuos (Lanktree *et al.*, 2018).

ADPKD se caracteriza principalmente por el desarrollo de quistes renales y su progresiva expansión que conducen a ESRD (Torres *et al.*, 2007). Puede asociarse con manifestaciones extrarrenales, tales como la hipertensión, presencia de quistes extrarrenales sintomáticos y hemorragia subaracnoidea debida a la rotura de aneurismas intracraneales (Torres *et al.*, 2007). La gran mayoría de los pacientes desarrollan los síntomas de la enfermedad entre los 20 y los 40 años de edad. Sin embargo, hay casos esporádicos en los que se pueden iniciar en la infancia (“early onset”) o incluso ya durante el desarrollo embrionario (“very early onset”) (Loftus *et al.*, 2013).

2.1 Genética de ADPKD

ADPKD es una enfermedad genéticamente heterogénea, asociada con mutaciones patogénicas en los genes *PKD1*, asociado a ADPKD-tipo I (*The European Polycystic Kidney Disease Consortium*, 1994), *PKD2*, asociado a ADPKD-tipo II (Mochizuki *et al.*, 1996), *GANAB* (Porath *et al.*, 2016) y más recientemente *DNAJB11* (Cornec-Le Gall *et al.*, 2018) y *ALG9* (Besse *et al.*, 2019), aunque mutaciones deletéreas en estos tres últimos genes se asocian a casos atípicos de ADPKD.

El gen *PKD1* fue descubierto en el año 1994 (*The European Polycystic Kidney Disease Consortium*, 1994) y se trata de un gen complejo formado por 46 exones, localizado en el cromosoma 16 (16p13.3) (Figura 1). En su estructura genómica presenta unas características que dificultan su análisis (Hughes *et al.*, 1995; Burn *et al.*, 1995):

- Alto contenido en GC, con gran cantidad de dinucleótidos CpG (Burn *et al.*, 1995).
- Aproximadamente el 70% del gen *PKD1* (exones 1-33) ha sufrido una duplicación intracromosómica a lo largo de la evolución humana, de tal forma que esa región presenta una homología con 6 pseudogenes con una identidad del secuencia de 95%-98% con el gen *PKD1* (Bogdanova *et al.*, 2001) (Figura 2).
- Contiene un tracto de polipirimidina de 2.5kb en el intrón 21, el más largo del genoma humano (Van Raay TJ *et al.*, 1996).

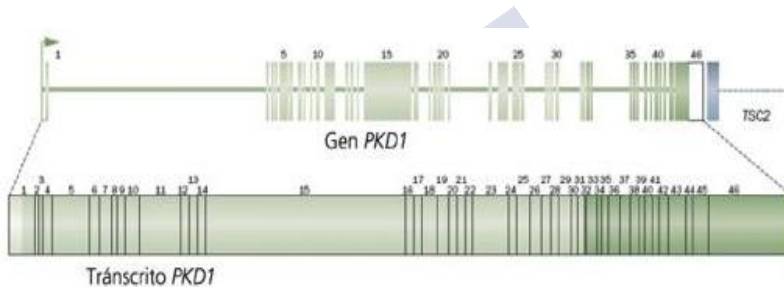


Figura 1. Esquema representativo de la estructura del gen *PKD1* y su transcrita más largo (figura adaptada de Torres *et al.*, 2007).

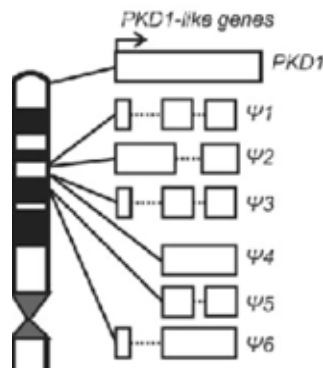


Figura 2. Esquema representativo de los pseudogenes homólogos al gen *PKD1*. La línea de puntos indica las deleciones existentes en los pseudogenes en comparación con el gen funcional. (Figura adaptada de Symmons O. *et al.*, 2008)

El gen *PKD2* fue identificado dos años después de la identificación del gen *PKD1* (año 1996) y se encuentra localizado en el cromosoma 4 (4q21). A diferencia del gen *PKD1*, tiene una estructura más simple (Harris PC y Torres VE, 2009) (Figura 3).

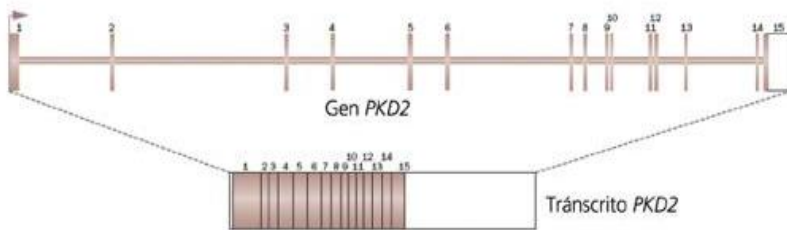


Figura 3. Esquema representativo de la estructura del gen *PKD2* y su transcritor más largo (figura adaptada de Torres *et al.*, 2007).

Se estima que, aproximadamente, un 80% de las familias ADPKD se asocian a mutaciones en el gen *PKD1*, mientras que un 15% de los casos se atribuyen a mutaciones en el gen *PKD2*. El restante 5-10% de los casos son genéticamente no resueltos o se asocian a mutaciones en otros loci (Cornec-Le Gall E *et al.*, 2018).

En el año 2016, Porath y colaboradores (Porath *et al.*, 2016) identificaron mutaciones causales en el gen *GANA β* , localizado en la región 11q12.3 del cromosoma 11 en pacientes ADPKD en los que no se había identificado ninguna variante causal en los genes *PKD1* y *PKD2*. Informan que las mutaciones patogénicas en *GANA β* representan aproximadamente un 0.3% del total de ADPKD. Mutaciones patogénicas en este gen se asocian con una manifestación más leve de PKD y con enfermedad poliquística hepática autosómica dominante (ADPLD, del inglés *Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease*) (Besse *et al.*, 2017)

Posteriormente, Cornec-Le Gall E y colaboradores (Cornec-Le Gall *et al.*, 2018), identificaron variantes patogénicas en el gen *DNAJB11* en familias ADPKD y ADPLD genéticamente no resueltas. La enfermedad asociada a mutaciones patogénicas en el gen *DNAJB11* es fenotípicamente distinta de las formas clásicas de ADPKD debido a que el tamaño de los quistes generalmente es más pequeño y por tanto no se visualizan riñones agrandados de tamaño, pero sí que se desarrolla fibrosis intersticial crónica. En algunos individuos afectados por mutaciones en *DNAJB11* se observaron quistes hepáticos pero no fibrosis hepática. *DNAJB11* representa aproximadamente el 1.2% de las familias ADPKD genéticamente no resueltas.

Recientemente, se descubrió *ALG9* como el último gen descubierto asociado a ADPKD (Besse *et al.*, 2019). El tamaño y la cantidad de quistes encontrados en los portadores de mutaciones en *ALG9* es generalmente menor que en los pacientes con ADPKD típica mostrando una gran variación en la expresividad. Los portadores de mutaciones en *ALG9* muestran un fenotipo predominantemente renal (Besse *et al.*, 2019).

2.2 Proteínas ADPKD

PKD1 y *PKD2* codifican para la policistina 1 (PC1, del inglés *Polycystin 1*) y la policistina 2 (PC2, del inglés *Polycystin 2*) respectivamente. La policistina 1 es una glicoproteína integral de membrana, localizada en el cilio primario de las células del epitelio renal, uniones adherentes, desmosomas y adhesiones focales. Contiene un largo dominio extracelular N-terminal, 11 dominios transmembrana y un corto dominio intracelular C-terminal (Wilson P. 2004). La región extracelular está compuesta por varios dominios: dominio de repeticiones de leucina (LRR, del inglés *Leucin-rich repeats*) flanqueado por dominios ricos en cisteína; un dominio lectina tipo C (*C- Lectin Domain*); un dominio de lipoproteína A de baja densidad (*LDL-*

A related); 16 dominios PKD; un dominio REJ (*REJ_Receptor Egg Jelly*) y un dominio GPS (*GPS_G protein coupled receptor Proteolytic Site*) o sitio proteolítico de receptor acoplado a proteína G.

El dominio PLAT se encuentra en el primer *loop* citoplasmático e interviene en las interacciones proteína-lípido y proteína-proteína.

En el extremo C-terminal existe un dominio *coiled-coil* (*coiled-coil domain*) a través del cual interacciona con la policistina 2 (Wilson P. 2004).

La PC2 es una proteína asociada a la membrana con 968 aa y una masa molecular de aproximadamente 110 kDa o TRPP2. PC2/TRPP2 tiene características similares al canal TRP. Contiene 6 segmentos transmembrana, un extremo C-terminal y un N-terminal, ambos en el citoplasma (Hofher *et al.*, 2011). PC2 es un canal iónico no selectivo permeable al calcio y, junto con PC1 forma un complejo receptor-canal implicado en la vía del calcio llamado complejo PC (Hanaok *et al.*, 2000) (Figura 4).

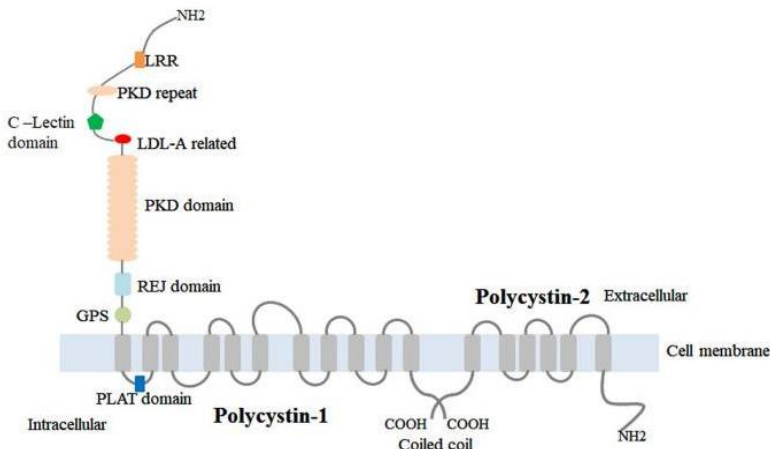


Figura 4. Representación de las proteínas PC1 y PC2 codificadas por los genes *PKD1* y *PKD2* (figura adaptada de Adrián Cordido *et al.*, 2017).

GANAB codifica para la subunidad alfa de la glucosidasa II (GII α) que es la subunidad catalítica de GII. GII α , junto con la subunidad reguladora de GII, GII β (o hepatocistina) forman una holoenzima funcional en el retículo endoplásmico que está implicada en el correcto plegamiento y translocación de glucoproteínas en el retículo endoplásmico, y parece ser que su disfunción se ha asociado a defectos de maduración y localización de PC1 (Besse *et al.*, 2017).

PC1 y PC2 interactúan a través del dominio *coiled-coil* formando un complejo de policistinas que está presente en los cilios primarios de las células epiteliales renales. Este complejo actúa como un sensor mecánico en el cilio, estableciendo de este modo la correcta orientación de las células en el epitelio. De hecho la ruta de señalización que comienza en el complejo PC1-PC2 parece estar implicada en la morfogénesis tubular (Quian *et al.*, 1997). Cuando existen cambios en la secuencia de alguna de las proteínas que comprometen su funcionalidad o su asociación, las células pierden su orientación espacial y comienzan a dividirse en orientaciones incorrectas dando lugar a la formación de quistes (Boletta y Germino, 2003) (Figura 5).

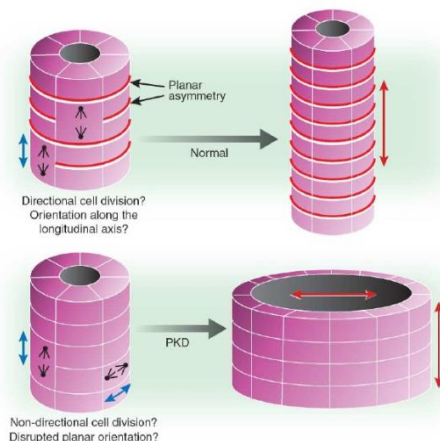


Figura 5. Morfogénesis tubular. Cuando hay una correcta orientación del huso mitótico y los centrosomas, se produce la división celular en la dirección del eje

longitudinal del tubo. Si se pierde esta orientación se produce un ensanchamiento del túbulo en forma de quiste (figura adaptada de Germino G.G., 2005)

A pesar de que todas las células del cuerpo de un individuo afectado portan la mutación, ya que se trata de mutaciones germinales, la formación de quistes es un proceso localizado que afecta a un pequeño número de células. Existen evidencias que sugieren que en estas células se produce una segunda mutación, de tipo somático, que provoca la pérdida del alelo nativo (*wild type*) y que inicia la formación del quiste (Wallace, 2011). Esto sugiere que la disminución de la señalización efectiva de las policistinas por debajo de umbral crítico lleva a una serie de cambios celulares que provoca la formación de quistes (Torres, 2008). Este modelo de enfermedad se conoce como mecanismo "two-hit" (Figura 6). Esto implica que la enfermedad es recesiva a nivel celular, hecho que explica la formación localizada de los quistes así como la manifestación clínica variable (Watnick *et al.*, 1998; García-González *et al.*, 2007). Además, una serie de factores contribuyen a la progresión de la enfermedad, como la vasopresina y otros agonistas del cAMP que estimulan la proliferación celular y la secreción de NaCl y agua, causando la expansión de los quistes (Wallace, 2011).

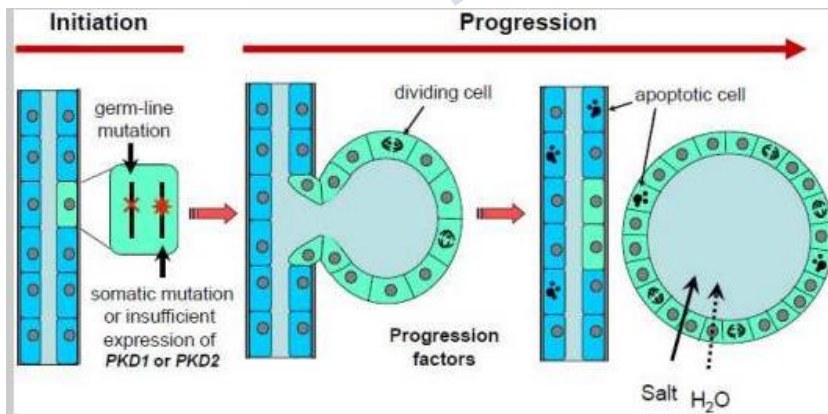


Figura 6. Modelo "two hit" de la poliquistosis renal (figura adaptada de Wallace, D. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochim Biophys Acta* (2011)

3 Enfermedad Poliquística Renal Autosómica Recesiva (ARPKD)

La enfermedad poliquística renal autosómica recesiva (ARPKD) es una enfermedad quística hereditaria, severa y una importante causa de morbilidad y mortalidad pediátrica con una incidencia estimada de 1 afecto cada 20000 nacidos vivos (Guay-Woodford *et al.*, 1995). La ARPKD es una de las causas más importantes de terapia renal sustitutiva y/ o transplante hepático en la infancia (Zerres *et al.*, 1998) y se caracteriza por la combinación de enfermedad quística renal bilateral y fibrosis hepática congénita (Igarashi P, 2002). La enfermedad puede iniciarse tanto en la edad perinatal, neonatal en la infancia o en la juventud (Desmet, 1992). Las formas perinatales se presentan al nacimiento con alargamiento bilateral, riñones hiperecogénicos y fallo renal severo. Los oligohidramnios resultantes de una producción urinaria intrauterina deficiente producen la secuencia de Potter con hipoplasia pulmonar y deformidades en la columna vertebral y las extremidades (Blyth, 1971).

Hasta el 30%-50% de los neonatos afectados mueren poco después del nacimiento por insuficiencia respiratoria (Guay-Woodford 2014). Los niños que no la presentan hasta después de los primeros meses de vida tienen una participación quística menos grave y un mejor pronóstico (Igarashi , 2002) (Deget, 2017) y los niños que sobreviven al periodo neonatal tienen una probabilidad de supervivencia del 56%-67% hasta los 15 años sin llegar a ESRD y una supervivencia prolongada hasta los 55 años. Otras manifestaciones clínicas de ARPKD en niños y adultos incluyen hipertensión sistémica (56%-70% de los pacientes), retraso en el crecimiento, infecciones del tracto urinario e hiponatremia (Igarashi, 2002).

3.1 Genética de ARPKD

ARPKD está causada por mutaciones patogénicas en el gen *PKHD1* (Onuchic *et al.*, 2002) y en el gen *DZIP1L*, descubierto recientemente (Lu *et al.*, 2017). El gen *PKHD1* está localizado en el cromosoma 6 (6p12.3-p12.2), es uno de los genes humanos más largos con un segmento genómico de $\approx 500\text{kb}$ constituido por 66 exones (Onuchic *et al.*, 2002).

PKHD1 codifica para una larga proteína denominada fibrocistina/poliductina (FPC), la cual tiene un largo dominio extracelular, un único dominio que atraviesa la membrana y una corta cola citoplasmática. Se sabe que la fibrocistina/poliductina, al igual que muchas otras proteínas asociadas con la patogénesis de la enfermedad poliquística renal, está presente en los cilios primarios de los túbulos renales y conductos biliares intrahepáticos (Wallace, 2011) y se sabe que la cola citoplasmática contiene una secuencia que dirige la proteína al cilio (Loftus y Ong, 2013).

La poliductina interacciona con PC2, sugiriendo que forma parte del mismo complejo proteico PC1 - PC2 que regula el calcio intracelular en respuesta a estímulos externos (Wallace, 2011), en el cual la fibrocistina sería crucial para la función del canal de calcio de la policistina 2 (Bergmann *et al.*, 2011). Además, debido a que actúan mediante la quinesina-2 se cree que todas estas proteínas participan conjuntamente en la regulación de la morfología tubular (García-González *et al.*, 2007).

4 Cistogénesis y cilio primario

La cistogénesis (formación de quistes) probablemente está causada por una aberrante proliferación celular y la apoptosis, pero todavía no está claro cómo se regula (Loftus y Ong., 2013).

La observación de que las proteínas quísticas localizan en el cilio primario y el cuerpo basal proporciona nuevos conocimientos sobre el mecanismo de las enfermedades quísticas renales.

Se han propuesto diferentes localizaciones para PC1/PC2, entre las que se incluyen el retículo endoplásmico, las membranas celulares apicales y basolaterales o los exosomas excretados (Grantham J. 2008). Sin embargo hay evidencias que apoyan su presencia en los cilios primarios como su papel central en la patogénesis de ADPKD. Los cilios son orgánulos que se expresan en casi todas las células y tejidos del cuerpo (Loftus *et al.*, 2013). Son orgánulos altamente compartimentalizados que funcionan como sensores de las señales del medio extracelular. Se forman como una sola protuberancia de la membrana plasmática apoyado por el axonema, un componente del citoesqueleto que se ensambla como un anillo de nueve dobletes de microtúbulos dispersos tangencialmente al centro de una configuración conocida como 9+0 (Lee *et al.*, 2011).

La función sensorial del cilio permite detectar, a través de receptores, una gran cantidad de señales extracelulares, como por ejemplo el flujo del fluido. Un mal funcionamiento de los cilios desempeña un papel importante en la enfermedad quística renal, ya que muchas de las proteínas alteradas en esta enfermedad están presentes en el cilio. Por tanto, da como resultado un conjunto de trastornos que se denominan ciliopatías (Hildebrandt *et al.*, 2011). Diferentes datos en modelos animales apoyan la idea de que defectos en estructura o función de los cilios primarios contribuyen a los mecanismos patogénicos de PKD (Gerdes *et al.*, 2009). Proteínas como la PC1, PC2 y la poliductina/fibrocistina (codificada por el gen *PKHD1*, ARPKD) se localizan en el cilio primario (Yorder *et al.*, 2002). Además la proteína codificada por el gen *DZIP1L*, recientemente descubierto y asociado a ARPKD, se localiza en los centriolos y los cuerpos basales de los cilios y también se asocia con defectos del tráfico ciliar (Lu *et al.*, 2017) (Figura 7).

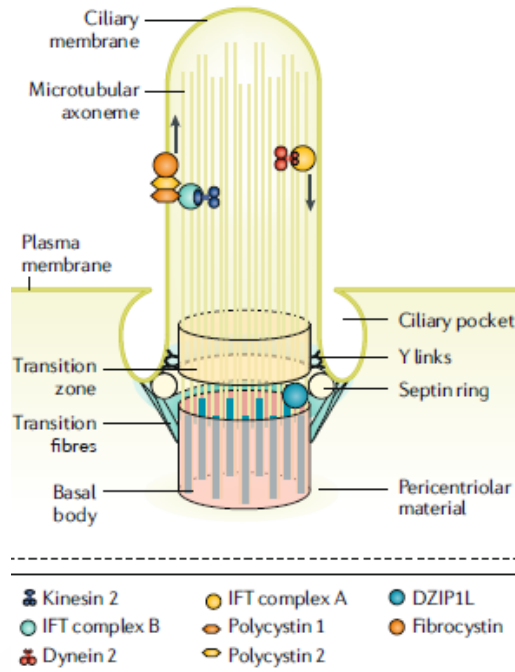


Figura 7. Localización de las polycistinas y de la proteína codificada por el gen *DZIP1L* en el cilio primario (figura adaptada de Bergmann *et al.*, 2018).

5 Formas atípicas de la Poliquistosis Renal:

TSC1 y *TSC2*

La esclerosis tuberosa (TSC, del inglés *tuberous sclerosis*) es una enfermedad autosómica dominante que afecta a 1 de cada 600 individuos. Se caracteriza por el crecimiento anormal del tejido en múltiples órganos entre los que se incluyen el cerebro, la piel, el corazón, los pulmones y los riñones. Está causada por mutaciones patogénicas en los genes *TSC1* y *TSC2*. El gen *TSC1* se localiza en el cromosoma 9q34, codifica para la hamartina y representa el 20% de los casos; mientras que el gen *TSC2* se encuentra en el cromosoma 16p13, codifica para la tuberina y

representa aproximadamente el 80% restante de los casos. La enfermedad tiende a ser menos severa en pacientes con mutaciones patogénicas en el gen *TSC1* que pacientes con mutaciones en el gen *TSC2* (Sancak *et al.*, 2005).

PRKCSH

El gen *PRKCSH* codifica para la subunidad beta no catalítica de la glucosidasa II, enzima necesaria para el correcto paso de las proteínas a través del retículo endoplásmico. Las mutaciones patogénicas en este gen (localizado en la región cromosómica 19p13.2-13.1) se han asociado con poliquistosis hepática autosómica dominante (*autosomal dominant polycystic liver disease*), que es fenotípicamente indistinguible de la ADPKD hepática, tanto en las manifestaciones clínicas como a nivel histológico (Li *et al.*, 2003).

SEC63

Mutaciones patogénicas en el gen *SEC63* (localizado en el cromosoma 6q21), que codifica para un componente de la maquinaria de traslocación de proteínas en el retículo endoplásmico, también causan la poliquistosis hepática autosómica dominante ADPLD (Davila *et al.*, 2004).

HNF1 β

HNF1 β (*hepatocyte nuclear factor-1 β*) es un miembro de la superfamilia de factores de transcripción que codifica para el factor de transcripción 2 (TCF2) y funciona como un homodímero o heterodímero con *HNF1 α* . El gen *HNF-1 β* se localiza en el cromosoma 17q12 (Loftus y Ong, 2013).

El factor nuclear de hepatocitos 1 β se expresa en gran medida en otros órganos, tales como el riñón, el páncreas, intestino,

pulmón y tracto genital. En el riñón *HNF-1 β* se restringe a las células epiteliales que componen los túbulos renales y los ductos colectores. Las mutaciones en este gen producen quistes renales (Bergmann et al., 2011) y diabetes mellitus no insulino-dependiente, como la diabetes tipo MODY (*Maturity – Onset Diabetes of the Young*). Se caracteriza por una herencia autosómica dominante y una edad temprana de inicio y generalmente se diagnostica antes de los 25 años de edad. Las mutaciones en *HNF-1 β* son la causa del síndrome de diabetes y quistes renales (*renal cysts and diabetes syndrome*, RCAD), también llamado MODY5, y se asocia además a malformaciones del tracto urinario. Sin embargo, muchos pacientes tienen un fenotipo restringido a la afectación renal sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Ulinski et al., 2006). El fenotipo renal es variable, tanto dentro de las familias como entre ellas e incluye la displasia renal multiquística, hipoplasia renal glomeruloquística con cálices y papilas anormales y enfermedad quística bilateral similar a la observada en ADPKD, oligomeganefronia y agenesia renal (Bingham et al., 2004). Las mutaciones en *HNF-1 β* son una causa muy importante de riñones bilaterales fetales hiperecogénicos (Decramer et al., 2007).

Además de estos genes relacionados con las formas atípicas de la poliquistosis renal, existen otros muchos ya descritos vinculados a la poliquistosis renal ultra-rara, tales como: *VHL*, *BBS*, *NPHP*, *MKKS*, *OFD1*, *UMOD*, entre otros muchos (Anexo 1, lista de genes asociados a las formas comunes, raras y ultra-raras de PKD – panel 72 genes).

6 Diagnóstico de ADPKD

El diagnóstico de ADPKD depende de la etapa en la que se encuentre la enfermedad (Cordido et al., 2017). Cuando la enfermedad está completamente establecida, el diagnóstico se

basa en el historia del paciente y el examen físico, desde el punto de vista clínico (Pei, 2006; Igarashi , 2002). Sin embargo, aportar un diagnóstico definitivo puede resultar complicado ya que dicha enfermedad se puede confundir con otras que presentes síntomas similares. Por tanto, se hacen necesarias otras pruebas complementarias como las pruebas de imagen o las pruebas genéticas, las cuáles aportan un diagnóstico definitivo, permitiendo anticiparse a la enfermedad y permitiendo definir un posible pronóstico de la misma.

6.1 Diagnóstico de ADPKD mediante técnicas de imagen

La ecografía es la técnica de imagen más utilizada para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con ADPKD. Entre sus ventajas destacan la capacidad de detectar quistes de 1 cm de diámetro, que está ampliamente disponible, que es barata y que no requiere ni de radiación ni de contraste (O'Neill *et al.*, 2005). Además, también resulta útil para explotar la afectación extrarrenal abdominal de ADPKD, como es la presencia de quistes hepáticos o pancreáticos que apoyan el diagnóstico de la enfermedad (Mosetti *et al.* 2003).

La tomografía computerizada (TC) es más sensible que la ecografía, permitiendo detectar quistes de 0.5 cm de diámetro. Así mismo también es mejor que la ecografía en la identificación de tumores renales. Como inconvenientes se encuentran la exposición de los pacientes a radiación y el precio, ya que la TC es más cara que la ecografía y, por tanto, no se utiliza de forma rutinaria para el diagnóstico (Irazabal *et al.* , 2015).

La resonancia magnética (RM) es también más sensible que la ecografía e incluso más sensible que el TC. Puede ser incluso más útil para distinguir el carcinoma de las células renales de los quistes simples y es la mejor técnica de imagen para monitorizar el volumen renal durante el tratamiento con el objetivo de

evaluar la eficiencia del mismo (Irazabal *et al.*, 2015). Presenta como inconvenientes que no se utiliza de forma rutinaria debido a su elevado coste, debido a que es una técnica laboriosa y además requiere de un complejo análisis de imagen para calcular el volumen total de los riñones (Bae *et al.*, 2013).

Sin embargo, todas estas pruebas de imagen con frecuencia no se realizan en un subconjunto de la población con ADPKD, incluidos aquellos que son individuos jóvenes en riesgo o pacientes con enfermedad renal quística atípica o de novo (Pei, 2006).

6.2 Diagnóstico genético de ADPKD:

Con el desarrollo de las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación, el diagnóstico genético de ADPKD es menos caro y laborioso.

Está principalmente indicado en los siguientes casos:

- Individuos que requieren confirmar o descartar el diagnóstico de ADPKD, tales como los familiares de los pacientes con ADPKD candidatos a ser donantes vivos.
- Pacientes sin antecedentes familiares de ADPKD, debido a que distintas enfermedades renales quísticas pueden presentar síntomas similares con ADPKD.
- Familias en las que uno de los miembros manifiesta la enfermedad a una edad muy temprana, ya que podrían estar alteradas ambas copias del gen *PKD1* presentando un alelo hipomórfico o estar causados por herencia oligogénica (mutaciones en más de un gen PKD) (Rossetti *et al.*, 2009; Bergmann *et al.*, 2011).
- Pacientes que desean consejo genético, especialmente las parejas que solicitan diagnóstico genético preimplantacional.

El diagnóstico genético se puede abordar a partir de dos aproximaciones: análisis de ligamiento y análisis mutacional:

Análisis de ligamiento:

El análisis de ligamiento es un estudio indirecto que permite determinar si es el gen *PKD1* o el gen *PKD2* el causante de la enfermedad en una determinada familia. Se basa en identificar el haplotipo que segrega con la enfermedad en la familiar, es decir, el haplotipo que comparten los familiares afectados y que no presentan los no afectados.

Sin embargo, el análisis de ligamiento tiene como principal limitación que sólo puede ser utilizado en casos familiares. Es necesario que en el estudio participen individuos afectados y familiares sanos, y sólo algunas familias son lo suficientemente grandes para que sea posible confirmar el ligamiento a uno de los genes *PKD1* o *PKD2* y descartar el ligamiento a otro gen.

Existen fenómenos como la presencia de mutaciones de novo, alelos hipomórficos, (Vujic *et al.*, 2010) recombinaciones y mosaicismo (Harris *et al.*, 2010) que pueden complicar el análisis de ligamiento.

Análisis mutacional:

El análisis mutacional es un método de análisis directo. Se basa en realizar la secuenciación de los 46 exones del gen *PKD1* y los 15 exones del gen *PKD2*. Sabiendo que el gen *PKD1* es el responsable de aproximadamente el 80% de los casos de ADPKD se empieza el análisis por dicho gen. En el caso de que el resultado sea negativo o si algún familiar ha llegado a ESRD después de los 70 años se realiza la secuenciación del gen *PKD2*. En caso de que la secuenciación no permita identificar ninguna mutación patogénica responsable de la enfermedad, se debe realizar la técnica MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) que detecta grandes deleciones y

duplicaciones en aproximadamente un 4% de los casos (Consugar *et al.*, 2008).

Mediante el análisis mutacional, en contraposición al análisis de ligamiento, se pueden estudiar casos aislados, pequeñas familias y casos con un diagnóstico clínico incierto. Sin embargo el análisis de los genes *PKD1* y *PKD2* presenta dificultades como son:

- La elevada heterogeneidad alélica de estos genes (Harris *et al.*, 2010; Rossetti *et al.*, 2007).
- La complejidad del gen *PKD1* debido a la existencia de 6 pseudogenes con un 98% de identidad de la secuencia en los exones 1-33 del gen *PKD1* (Hughes, 1995; García-González *et al.*, 2007) de ahí que M.A. García-González *et al.*, desarrollaran un test genético molecular para ADPKD (comercializado por PKDx®, AthenaDiagnostics, Inc) con una estrategia especial para secuenciar la región replicada de *PKD1* mediante PCR Long-Range con primers específicos (García-González *et al.*, 2007).
- La existencia de mosaicismo (Harris *et al.*, 2010).
- La dificultad en la interpretación del efecto de las mutaciones identificadas. Aunque el efecto de muchas de ellas ya ha sido descrito, todavía existen muchas variantes de las cuales se desconoce su potencial patogénico, de ahí que sea tan importante el desarrollo de nuevas estrategias de detección de mutaciones, así como la validación funcional de las mismas (Audrézet *et al.*, 2012).

El concepto de secuenciación masiva (*next generation sequencing*) se refiere a los nuevos métodos de secuenciación que permiten la producción de gran cantidad de reacciones de secuenciación en paralelo. Esto permite mejorar las limitaciones de tamaño, tiempo y costes que tenía la secuenciación tradicional por método Sanger (Reis-Filho, 2009; Rossetti *et al.*, 2012).

6.3 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una de las opciones reproductivas actualmente disponibles que se debe tener en cuenta y se debe explicar en las consulatas de consejo genético que deben recibir los pacientes con enfermedades genéticas hereditarias, en este caso ADPKD. El DGP incluye el diagnóstico genético de los embriones cultivados *in vitro* y permite la selección de los embriones libres de mutación para su transferencia en el útero materno.

Frente al diagnóstico prenatal presenta la ventaja de evitar recurrir al aborto, lo que resulta éticamente menos complejo, pero al mismo tiempo presenta algunos inconvenientes como el requerimiento de una fecundación *in vitro*, elevado coste económico, puede ser cuestionable éticamente y se asocia a un importante impacto psicológico (Ars *et al.*, 2014).

7 Pronóstico. Correlación fenotipo-genotipo en ADPKD

Pacientes con mutaciones patogénicas en el gen *PKD1* tienen riñones más grandes y llegan antes a ESRD que los pacientes con mutaciones en *PKD2* (53.4 años *versus* 72.7 respectivamente). A nivel alélico, las mutaciones de tipo truncante (*frameshift ins/del*, *stopgain* y *splicing*) se asocian con una edad más temprana de inicio de ESRD que las mutaciones no truncantes (55.6 años promedio y 67.9 respectivamente) (Harris, 2013). Además la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) ajustada a la edad y sexo es más baja en los pacientes que portan mutación en *PKD1* en comparación con los que portan mutación en *PKD2*. Lo contrario ocurre con el volumen renal total ajustado a la altura (htTKV) (Harris *et al.*, 2006) (Heyer *et al.*, 2016).

En cuanto a *GANAB*, mutaciones en este gen se asocian con un fenotipo renal suave, parecido al que se observa en pacientes que portan mutación en el gen *PKD2* (Porath *et al.*, 2016).

La enfermedad asociada a mutaciones en el gen *DNAJB11* es fenotípicamente distinta de las formas clásicas de ADPKD debido a que el tamaño de los quistes generalmente es más pequeño y por tanto no se visualizan riñones agrandados de tamaño, pero sí que se desarrolla fibrosis intersticial crónica. En algunos individuos afectados por mutaciones en *DNAJB11* se observaron quistes hepáticos pero no fibrosis hepática (Corney-Le Gall *et al.*, 2018)

No sólo tiene importancia el gen mutado, sino que se observa una fuerte correlación entre el tipo de mutación y la severidad de la enfermedad. Las mutaciones truncantes (*frameshift, splicing y stop codon*) en el gen *PKD1* predicen un peor pronóstico de la enfermedad con menores eGFRs y mayores htTKV en comparación con las mutaciones no truncantes en *PKD1* o mutaciones en *PKD2* (Harris *et al.*, 2006) (Heyer *et al.*, 2016) asociándose éstas a una enfermedad más suave. Además, los hombres con mutaciones truncantes presentan riñones más grandes y tienen mayor riesgo de llegar a ESRD, mientras que las mujeres con este tipo de mutaciones presentan un fenotipo hepático más severo.

También hay que tener en cuenta que las manifestaciones de ADPKD en pacientes de una misma familia o distintos pacientes con la misma mutación pueden presentar distinta severidad de la enfermedad y una progresión diferente de la enfermedad. Esto puede ser debido a la presencia de variación en un gen modificador, que es lo que se conoce como interacción génica (García Gonzalez, 2007) (Bergmann *et al.*, 2011), que puede agravar o atenuar el fenotipo causado por la mutación primaria (García Gonzalez, 2007) (Bergmann *et al.*, 2011).

8 Principales manifestaciones extrarrenales en ADPKD

Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una manifestación muy frecuente en los pacientes con ADPKD. El 60% de los pacientes desarrollan HTA antes de presentar alteraciones de la función renal (Eccder *et al.*, 2001). La aparición de la HTA es más precoz en pacientes que portan mutación en el gen *PKD1* que en aquellos que portan mutación en el gen *PKD2* y en aquellos pacientes poliquísticos, cuyos padre, afectos o no por la enfermedad, presentan HTA (Schrier *et al.*, 2003).

Riesgo cardiovascular global

Parte del mayor riesgo cardiovascular que presentan los pacientes con ADPKD va ligado a la presencia de HTA como factor de riesgo. Aproximadamente el 50% de los pacientes poliquísticos con HTA presentan hipertrofia ventricular izquierda diagnosticada mediante ecocardiograma (Chapman *et al.*, 1997) aunque mediante resonancia magnética y en pacientes tratados con inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) la prevalencia es menor (Perrone *et al.*, 2011). El riesgo cardiovascular de estos pacientes va ligado también a la presencia de enfermedad cardiovascular establecida y la enfermedad renal crónica en estadio 4 o 5 o la proteinuria superior a 300mg/24h son considerados equivalentes de enfermedad cardiovascular establecida según las guías de la Sociedad Europea de HTA y Cardiología (Mancia *et al.*, 2013).

Dolor agudo o crónico, infección quística y sangrado

Las principales causas del dolor agudo son pielonefritis, infección quística, hemorragia quística y urolitiasis (Grantham , 2008). Tanto los quistes renales como los hepáticos pueden ser sintomáticos. La hemorragia o la ruptura de los quistes a menudo

se presenta como un dolor agudo que puede estar acompañado de hematuria macroscópica y/o anemización.

La infección quística se suele presentar con fiebre y dolor lumbar o abdominal. Las pruebas de imagen ayudan al diagnóstico diferencial de las causas del dolor lumbar o abdominal y a localizar el quiste infectado (Jouret *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2009).

El 20-36% de los pacientes con ADPKD tienen urolitiasis, que también puede causar dolor agudo. Los cálculos de ácido úrico son más frecuentes que los de oxalato de calcio (Torres *et al.*, 1993).

Las principales causas del dolor crónico son el aumento del tamaño de los riñones o del hígado.

Enfermedad poliquística hepática

La enfermedad poliquística hepática es la manifestación extrarrenal más frecuente en los pacientes con ADPKD. Se define como la presencia de al menos 20 quistes simples en el hígado.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de quistes hepáticos son: la edad, el sexo (más frecuente en mujeres jóvenes), múltiples embarazos, toma de estrógenos, terapia hormonal sustitutiva o anticonceptivos (Gevers *et al.*, 2013).

La mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos y tan sólo una pequeña proporción desarrolla una enfermedad hepática masiva. La principal sintomatología deriva de la hepatomegalia que puede provocar compresión extrínseca de órganos torácicos y abdominales: distensión abdominal, dolor abdominal, reflujo gastroesofágico, náuseas, vómitos, etc. El dolor abdominal suele ser la manifestación más frecuente. El parénquima hepático se conserva a pesar del crecimiento de los quistes hepáticos, por lo

que los quistes, por sí solos, es raro que causen insuficiencia hepática. (Pirson , 2010; Luciano *et al.*, 2014).

La enfermedad poliquística hepática puede causar complicaciones agudas tales como infección o sangrado quístico. La infección se caracteriza clínicamente por dolor abdominal en hipocondrio derecho y fiebre (Gevers *et al.*, 2013).

El sangrado intraquístico suele ser raro. La sintomatología puede ser similar a la de un quiste infectado aunque la fiebre es poco frecuente. El dolor abdominal suele ser más intenso.

La rotura del quiste es excepcional y puede causar dolor abdominal y ascitis (Luciano *et al.*, 2014).

Aneurismas intracraneales

La prevalencia de aneurismas intracraneales (AIC) en pacientes con ADPKD es aproximadamente un 8%, cinco veces mayor que en la población general (Grantham, 2008; Pirson, 2010; Torres *et al.*, 2007). Los AIC son normalmente asintomáticos, se sitúan en la circulación anterior y miden menos de 6 mm. La rotura de AIC puede dar lugar a una hemorragia subaracnoidea provocando la muerte (30-40%) o la incapacidad severa (30%) (Pirson , 2010; Chauveau *et al.*, 1994). El riesgo de ruptura se correlaciona con el tamaño del aneurisma y con la existencia de antecedentes familiares de ADPKD con AIC (Chauveau *et al.*, 1994; Pirson, 2002) pero también con la localización, presencia de saco aneurismático, existencia de HTA, consumo de tabaco, cocaína, utilización de estrógenos y/o anticoagulantes (Pirson, 2002; Ring *et al.*, 2007).

9 El tratamiento renal sustitutivo en ADPKD

La supervivencia de los pacientes con ADPKD en tratamiento renal sustitutivo (TRS) es más alta que la de los pacientes no afectados de ADPKD. Las complicaciones renales pueden persistir aún después de haber llegado a enfermedad renal crónica (ERC) avanzada o terminal pero raramente dan lugar a problemas serios (Martinez *et al.*, 2013; Perrone *et al.*, 2001).

Entre las diferentes modalidades de TRS, la diálisis peritoneal ofrece un mejor pronóstico y calidad de vida a los pacientes con ADPKD que a aquellos que no son portadores de esta enfermedad como causa de ERC (Abbott *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2010). Sin embargo en pacientes con riñones y/o hígados muy grandes, la carencia de espacio puede restringir el área disponible para el intercambio peritoneal. En estos casos debe considerarse la hemodiálisis como mejor opción al igual que podría ocurrir en aquellos pacientes con diverticulitis recurrente (Norby *et al.*, 2000).

10 Tratamiento de ADPKD

La ADPKD es una enfermedad sistémica con afectaciones renales y extrarrenales graves. La detección temprana de los síntomas es esencial para manejar la progresión de la enfermedad. Los tratamientos de referencia se centran en las complicaciones clínicas de la enfermedad no en la enfermedad en sí, y en el manejo de la enfermedad renal terminal cuando se produce.

No existía ningún tratamiento específico para la ADPKD hasta que se publicaron los resultados del ensayo clínico fase III-IV TEMPO 3:4 que puso a prueba la eficiencia antagonista del receptor V2 de la vasopresina: tolvaptán (Torres *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2017). En mayo del 2015 la Agencia Europea del

Medicamento (EMA) aprobó el uso del tolvaptán para ADPKD, así como las autoridades reguladoras de Japón, Canadá, Corea y Suiza. La EMA indicó la administración del tratamiento en individuos rápidos progresadores de la enfermedad. En base a dicha indicación los grupos de trabajo de enfermedades renales hereditarias vieron necesario definir los criterios para clasificar a los pacientes con progresión rápida demostrada o probable mediante un algoritmo (figura 8).



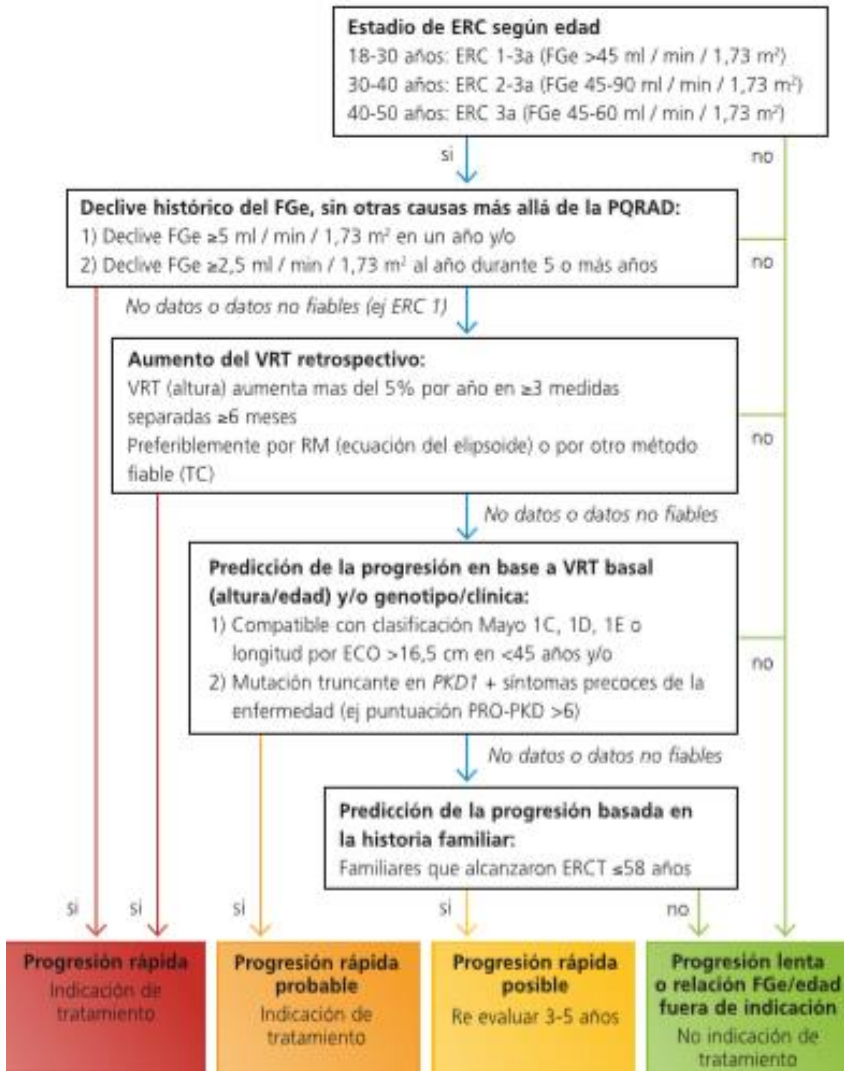


Figura 8. Algoritmo para la identificación de pacientes poliquísticos candidatos a ser tratados con tolvaptán (figura adaptada de la guía de *Apunte sobre el uso de tolvaptán para la poliquistosis renal autosómica dominante*: “Torra R. Apuntes sobre el uso de tolvaptán para la poliquistosis renal autosómica dominante. Fundación Puigvert GTERH-SEN. WGIKD-EDTA”).

11 PROPKD Score

El curso de la enfermedad poliquística renal autosómica dominante varía entre los individuos, de forma que algunos alcanzan el ESRD antes de los 40 años y otros no llegan a necesitar terapia renal sustitutiva. Partiendo de esto, Cornec-Le Gall y colaboradores (Cornec-Le Gall *et al.*, 2016) desarrollaron un modelo pronóstico, el PROPKD score, para predecir la supervivencia en pacientes ADPKD y permitir la personalización del tratamiento terapéutico en los casos de ADPKD. Realizaron un estudio transversal en 1341 pacientes de la cohorte GenKyst y evaluaron la influencia de los factores clínicos y genéticos en la supervivencia renal. Identificaron 4 variables que se asociaron significativamente con la edad de inicio de ESRD y desarrollaron un sistema de puntuación entre 0 y 9: ser hombre: 1 punto; presentar hipertensión arterial antes de los 35 años: 2 puntos; presentar el primer evento urológico antes de los 35 años: 2 puntos; ser portador de mutación patogénica en el gen *PKD2*: 0 puntos; ser portador de mutación patogénica de tipo no truncante en el gen *PKD1*: 2 puntos; ser portador de mutación patogénica de tipo truncante en el gen *PKD1*: 4 puntos. Definieron también 3 categorías de riesgo de progresión a ESRD: riesgo bajo (0-3 puntos), riesgo intermedio (4-6 puntos) y riesgo alto (7-9 puntos) con edades medias para el inicio de ESRD de 70.6 años, 56.9 años y 49 años, respectivamente. Una puntuación ≤ 3 descarta la progresión a ESRD antes de los 60 años con un valor predictivo negativo del 81.4%, mientras que una puntuación > 6 pronostica el inicio de ESRD antes de los 60 años con un valor predictivo positivo del 90.9%.



OBJETIVOS

Nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de estrategias para el diagnóstico genético de las enfermedades renales, entre ellas la enfermedad poliquística renal.

Basándose en las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación se han diseñado paneles de genes en base a la incidencia poblacional de los mismos: panel para los 8 genes más comunes a la enfermedad renal y panel para los 72 genes más comunes, raros y ultra-raros asociados a la enfermedad, utilizando en ambos casos la tecnología Haloplex y la plataforma de secuenciación Ion Torrent (publicados en la tesis de Lisbeth Sousa).

Dada la versatilidad que tienen estas tecnologías, en este trabajo se ha generado un nuevo diseño que incluye los 11 genes más comunes asociados a PKD y que está sustituyendo al panel de 8 genes.

Sin embargo, y dado el inconveniente que presentan este tipo de tecnologías para la secuenciación de genes con pseudogenes como es el caso del gen *PKDI*, se ha desarrollado una estrategia basada en amplicones para secuenciar la región replicada del *PKDI* (que presenta una homología con 6 pseudogenes con una identidad de la secuencia de 95%-98% con el gen *PKDI*) así como para los genes *PKD2* y *GANAβ*, con el objetivo de, mediante un solo test genético, poder diagnosticar a pacientes ADPKD.

Una vez desarrolladas todas las estrategias, nos planteamos dos objetivos principales:

1. Aplicando y combinando las distintas estrategias desarrolladas, nos proponemos demostrar cuál es la estrategia más eficiente para el diagnóstico de pacientes ADPKD.
2. Aplicar dicha estrategia para diagnosticar a la población gallega con el objetivo de establecer el mapa genético gallego de la enfermedad y mejorar el conocimiento de la misma.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes para el estudio

El estudio incluye a pacientes con sospecha clínica de enfermedad quística renal hereditaria. La cohorte de pacientes utilizada para la optimización de las estrategias de diagnóstico que proponemos en este trabajo procede de distintos hospitales de España, aunque muchos de los pacientes pertenecen al Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Los pacientes analizados dentro del Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (FIS2016-2018)” proceden de los distintos hospitales de referencia de Galicia. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado pertinente.

2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza a partir de muestras de sangre periférica de los pacientes. Junto con la solicitud de diagnóstico de la prueba genética se requiere el envío de 2 tubos malva de sangre con EDTA. Dicha sangre se alicuota y las alicuotas se congelan a -20°C. Cuando se necesita el ADN para realizar las pruebas genéticas se descongela una alícuota y se extrae el ADN utilizando el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)*. La extracción del ADN se hace siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto de las

alícuotas permanecen congeladas por si posteriormente se necesita volver a realizar la extracción de ADN.

Una vez obtenido el ADN se cuantifica y se chequea su calidad utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop* (*ThermoScientific, Rochester, NY, USA*). Las muestras de ADN se almacenan congeladas en viales eppendorf de 1,5 ml a -20°C.

3. Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes asociados a enfermedades quísticas renales hereditarias a través de las publicaciones disponibles y distintas fuentes virtuales como: *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*, *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, *Pubmed*, *UCSC Genome Bioinformatics* y *GenBank*.

4. Secuenciación Tradicional por Método Sanger

En este trabajo se utiliza la secuenciación tradicional por método Sanger en la realización de los estudios de portadores (validación en los miembros familiares de la mutación identificada en el caso índice de la familia mediante NGS) y en la validación de las variantes posiblemente causales de enfermedad identificadas mediante la tecnología NGS.

El primer paso de la Secuenciación por método Sanger es hacer una PCR que amplifique la región del ADN que se quiere secuenciar. Los primers necesarios para realizar la amplificación se diseñan utilizando el programa *Primer Express v. 2.0* (*Life Technologies*).

La mezcla de reacción para la PCR se prepara con los siguientes reactivos: 12,5 µl *Biomix 2x* (*Bioline*®), 5 µl reactivo *Q* (*Quiagen*®), 0,6 µl del primer *forward* (concentración 20µM) y 0,6 µl primer *reverse* (concentración 20µM). Se añaden 2 µl de DNA (aunque esta cantidad depende de la concentración del DNA; se utiliza aproximadamente 100ng de DNA) y el resto del volumen se completa con agua ultrapura (*MiliQ*, *Millipore*®) hasta un volumen final de 25 µl. Además se prepara un control negativo con la misma mezcla, pero en vez de añadir DNA se añade el mismo volumen de agua ultrapura (*MiliQ*, *Millipore*®).

La amplificación se realiza en un termociclador ajustando las condiciones del programa en función de los primers utilizados y su temperatura de fusión, así como de la longitud del fragmento a amplificar.

Con el objetivo de comprobar la correcta amplificación se corre el producto de la PCR en un gel de agarosa al 1% en TBE 1x y con un 0,01% de bromuro de etidio. Se cargan 7 µl de muestra junto con 2 µl de tampón de carga en cada pocillo y se comparan los tamaños con un marcador de peso molecular comercial (*Hyperladder I*, *Bioline*® o *Hyperladder II*, *Bioline*®).

A continuación se realiza la purificación del producto de PCR, previa a la secuenciación. Para ello se añade 1 µl de exonucleasa (Exo) y 2 µl de fosfatasa alcalina (Sap) a cada tubo y se incuban en un termociclador a 37°C durante 15 minutos para que dichas enzimas eliminen todo el DNA que no sea los fragmentos amplificados y los *primers* y a continuación se incuban a 80°C durante 15 minutos para inactivar las enzimas.

Seguidamente se preparan las muestras para la reacción de secuencia en una placa de 96 pocillos, añadiendo 0,6 µl del cebador correspondiente (concentración 3µM), 1,4 µl de tampón de secuencia (*Applied Biosystems*®) y 1 µl de *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystems*®) sobre 3 µl de la muestra purificada. Luego se tapa la placa con una película adhesiva y se introduce en un termociclador con el siguiente programa: 4

minutos a 96°C, 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C y 3 minutos a 6°C, y al acabar estos ciclos un paso de 10 minutos a 60°C.

Al terminar la amplificación se añaden 3 µl de EDTA (concentración 125 mM) a cada muestra/pocillo y se agita la placa en un vórtex. A continuación se precipita el DNA con 36 µl de etanol al 100%, se agita y se deja incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga la placa a 2500g durante 30 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. Se repite este procedimiento con etanol al 70% durante 15 minutos y se deja secar la placa durante toda la noche a temperatura ambiente.

A la mañana siguiente se resuspende cada muestra de cada pocillo en 10 µl de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems®). Se centrifuga durante 2 minutos a 2000g y a continuación se realiza la secuenciación en un secuenciador capilar *ABI Prisma 3100 Avant* (Applied Biosystems®).

Los datos se analizan con el programa informático proporcionado por el fabricante *ABI Sequence Scanner* (Applied Biosystems®).

4.1 Secuenciación tradicional por Método Sanger para el gen *PKDI*

El protocolo de secuenciación descrito anteriormente se utiliza con cualquier gen a excepción de la región replicada (exones 1-34) del gen *PKDI*. En el caso de necesitar amplificar algún fragmento de esta región, primeramente se realiza una PCR Long Range (LR) con cebadores específicos desarrollados por García-González M.A., *et al.*, en 2007. Las condiciones específicas para la realización de la PCR LR y las secuencias de los cebadores se indican en el apartado 5.2.1 de material y métodos.

Posteriormente se realizan diluciones seriadas (10^{-4}) del producto de la PCR LR con el objetivo de eliminar contaminaciones genómicas y su producto se utiliza para la realización de *Nested* PCR. La mezcla de reacción se prepara con los siguientes reactivos: 12,5 μ l *Biomix 2x* (*Bioline*®), 5 μ l reactivo *Q* (*Quiagen*®), 0,6 μ l del primer *forward* (concentración 20 μ M) y 0,6 μ l primer *reverse* (concentración 20 μ M). Se añaden 2 μ l del producto de la PCR LR tras haber realizado las diluciones seriadas y el resto del volumen se completa con agua ultrapura (*MiliQ*, *Milipore*®) hasta un volumen final de 25 μ l. La amplificación se realiza en un termociclador ajustando las condiciones del programa en función de los primers utilizados y su temperatura de fusión, así como en función del tamaño del fragmento amplificado. A partir de aquí se chequea la correcta amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa, se purifica el producto de la *Nested* PCR y se realiza la reacción de secuencias siguiendo las mismas instrucciones que se describen en el apartado anterior.

5. Secuenciación mediante la tecnología NGS

Para la realización de la NGS se utiliza la plataforma de secuenciación Ion Torrent, disponible en la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX). La principal ventaja que ofrece este tipo de tecnología frente a la Secuenciación por método Sanger es mayor rapidez en la obtención de resultados y menor coste. La mayor rapidez es debida a que la NGS permite secuenciar varios genes en conjunto, así como distintos pacientes al mismo tiempo. Menor coste hace referencia a que el precio de secuenciar varios genes en conjunto mediante NGS resulta menor que si se secuenciase el mismo número de genes pero de forma individual mediante Secuenciación por método Sanger.

El primer paso a realizar es la generación de un diseño *in silico* que contiene las regiones de interés de los genes que se quieren secuenciar. Posteriormente se preparan las librerías con todas esas regiones de interés. Existen distintas tecnologías para la generación de las librerías. En este trabajo las tecnologías utilizadas fueron la tecnología comercial *Haloplex* (*Agilent Technologies*®) y una estrategia basada en amplicones que en un principio se utilizó para secuenciar la región replicada del gen *PKD1* pero que posteriormente se amplió a la secuenciación de los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*.

Una vez generadas las librerías, y ya que cada una de ellas lleva asignado un *barcode* (secuencia de nucleótidos que permite identificar a cada paciente y, por tanto, permite secuenciar varios pacientes distintos al mismo tiempo), se prepara un pool equimolar con todas ellas que se amplifica mediante PCR en emulsión. Posteriormente se carga en un chip que se introduce en el secuenciador. Actualmente este proceso de realización de la PCR en emulsión y carga del chip se realiza en el *Ion Chef System* (*Life Technologies*®) y la secuenciación se realiza en los secuenciadores Ion Torrent: *Ion PGM* (*Life Technologies*®) o *Ion Proton* (*Life Technologies*®). Una vez que finaliza el proceso de secuenciación se realiza un análisis de datos automatizado mediante el *Torrent Suite Software* (*Life Technologies*®).

5.1. Tecnología HaloPlex

En la tecnología HaloPlex el proceso de captura de las regiones diana se basa en una mezcla de enzimas de restricción y sondas específicas. Las sondas se unen a las zonas de corte de las regiones diana, capturándolas en forma circular y esos fragmentos de DNA circular se amplifican mediante PCR (Figura 9). Los códigos de barras (*barcodes*) hibridan junto con las sondas. HaloPlex dispone de 16 *barcodes*, por tanto, ese es el

número máximo de muestras que se pueden secuenciar en un chip.

1) Digest genomic DNA.



2) Hybridize the HaloPlex probe library in presence of the Barcode Primer Cassette. Hybridization results in gDNA fragment circularization and incorporation of barcodes and Ion Torrent sequencing motifs.



3) Capture target DNA-probe hybrids. Biotinylation of probe DNA allows capture using streptavidin-coated magnetic beads.



4) PCR amplify targeted fragments to produce a sequencing-ready, target-enriched sample.



Figura 9. Esquema del flujo de trabajo para la generación de las librerías mediante la tecnología HaloPlex (imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing*, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies).

5.1.1. Diseño de los paneles de genes mediante la tecnología HaloPlex

Utilizando la herramienta de diseño online de HaloPlex (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>) se generaron tres paneles de genes: dos de los paneles incluyen los genes más comunes asociados a enfermedades quísticas seleccionados en base a la incidencia poblacional: panel de 8 genes (*diseñado y publicado en la tesis de Lisbeth Sousa*) y posteriormente se amplió el número de genes generando otro panel de 11 genes y el otro panel incluye hasta 72 genes comunes, raros y ultra-raros conocidos asociados a enfermedades quísticas renales hereditarias (*diseñado y publicado en la tesis de Lisbeth Sousa*).

Mediante la utilización de esta herramienta de diseño se obtiene el porcentaje *in silico* de las regiones de interés que pueden ser capturadas. Como regiones de interés se consideraron las regiones exónicas, regiones UTRs y 50pb de regiones flanqueantes.

El panel de 8 genes incluye las regiones exónicas de los genes asociados a las formas más comunes de enfermedad renal quística hereditaria, las regiones UTRs y 50 pb de las regiones flanqueantes (tabla 1) y un nivel de astringencia de 1X. Con este nivel las sondas se diseñan sólo de forma que sean complementarias sólo en la región de interés del genoma, reduciendo la posibilidad de que se unan a los pseudogenes.

Posteriormente, y gracias a la posibilidad que ofrecen estas herramientas que permiten ir incorporando nuevos genes en el diseño, se generó un nuevo panel de enfermedad quística común que incluye 11 genes. En este caso, también se incluyeron las regiones exónicas de los genes de interés, las regiones UTRs, 50 pb de regiones flanqueantes (tabla 1) y un nivel de astringencia de 1X.

El panel con los 72 genes asociados a las formas comunes, raras y ultra-raras de la enfermedad, al igual que los anteriores, también incluía las regiones exónicas, las regiones UTR, regiones flanqueantes de 50pb (tabla 1) y un nivel de astringencia de 1X.

Tabla 1. Características de los diseños HaloPlex utilizados en este trabajo

Panel	UTRs	Región Flanqueante (bp)	Región Diana (bp)
Panel para enfermedad renal quística común (8 genes)	Si	50	108624
Panel para enfermedad renal quística común (11 genes)	Si	50	126661
Panel para enfermedad renal quística común, rara y ultra-rara (72 genes)	Si	50	688932

5.1.2. Preparación de librerías HaloPlex

Las librerías se generaron siguiendo el protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing* (Agilent Technologies®). Los kits necesarios para su preparación fueron: *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing* (Agilent Technologies®), *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter®), *Quant-iT dsDNA HS Assay Qubit* (Life Technologies®) y *Herculase II Fusion Enzyme with dNTPs* (Agilent Technologies®).

En primer lugar se chequeó la integridad del DNA mediante en electroforesis en gel de agarosa el 1% y se evaluó su pureza mediante espectrofotometría, utilizando el instrumento *Nanodrop* (ThermoScientific®). Posteriormente cada muestra se cuantificó en el fluorímetro *Qubit3.0* (Invitrogen/Life Technologies®, Paisley, UK), utilizando reactivos de alta sensibilidad, y se diluyó hasta una concentración de 5ng/µl.

A continuación, 45 µl de cada muestra, correspondientes a 225ng de DNA genómico se digirieron con 16 enzimas de restricción distintas. De la misma forma que se digirieron las muestras también se digirió el DNA Control (ECD_Enrichment Control DNA). Con el objetivo de chequear la eficiencia de las enzimas se observó el tamaño de los fragmentos en las 8 digestiones del control, asumiendo que si la digestión ha salido correctamente en el control, también ha salido bien en las muestras. Para ellos se utilizó en *TapeStation 2200* (Agilent Technologies®) junto con reactivos de alta sensibilidad (Figura 10).

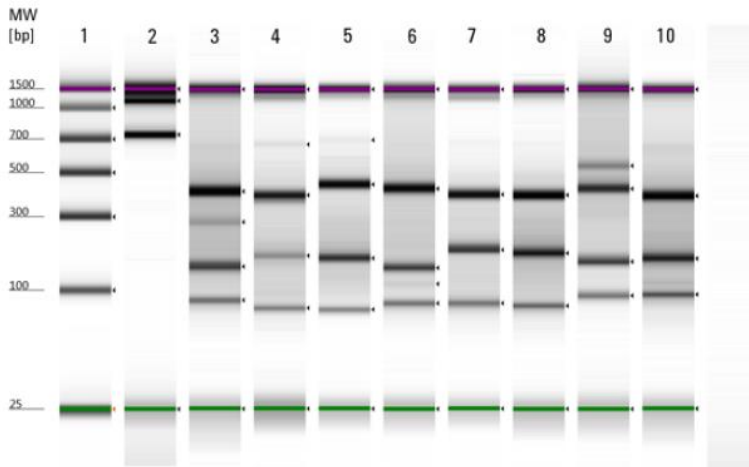


Figura 10. Validación de la digestión mediante *TapeStation 2200*. Carril 1: Marcador de peso molecular (*ladder*); Carril 2: control de DNA no digerido; Carriles 3-10: Digestión del control con los 8 pares de enzimas de restricción. (Imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing*, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies).

Posteriormente, los fragmentos de DNA digeridos se hibridaron con las sondas biotiniladas y con los *barcodes* durante un periodo de 3 horas para el caso de los paneles de 8 genes y 11 genes y de 16 horas para el panel de 72 genes.

El tiempo de hibridación depende de la longitud (en pb) de la región diana que se quiere amplificar. Los 2 primeros paneles

corresponden al *Tier 1* (rango de tamaño de 1-250Kb) y el panel de 72 genes es de *Tier 2* (rango de tamaño de 251Kb-2.5Mb).

A continuación se capturaron las sondas hibridadas mediante *beads* magnéticas de estreptavidina y los fragmentos capturados se unieron a las sondas para crear moléculas de DNA circular. Seguidamente se amplificaron las librerías mediante PCR y se purificaron con *beads AMPure XP (Beckman Coulter Genomics®)*.

Las librerías se validaron en el *TapeStation 2200* utilizando reactivos de alta sensibilidad. El *TapeStation* permite obtener la concentración de cada librería, pero dicha cuantificación se tiene que hacer teniendo en cuenta el área comprendida entre 150pb y 500pb, que es el rango de tamaño en el que se encuentran los amplicones obtenidos (Figura 11).

Finalmente, se prepara un pool equimolar de las librerías a una concentración final de 50pM teniendo en cuenta el área comprendida entre 150pb y 500pb

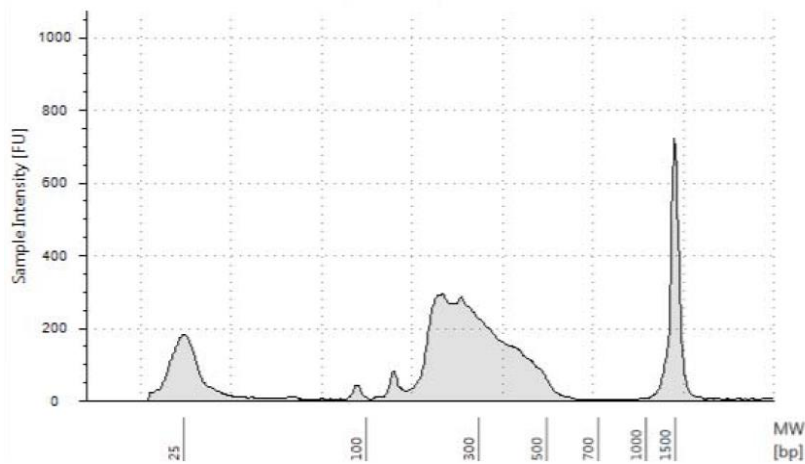


Figura 11. Perfil obtenido de la validación de una librería obtenida mediante la tecnología HaloPlex utilizando el TapeStation 2200 (imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing*, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies).

5.2. Tecnología de amplicones para NGS

El gen *PKDI* contiene seis pseudogenes con una homología de secuencia del 98% con el gen *PKDI*. Esto hace que todas las estrategias comerciales disponibles hasta el momento no sean capaces de discernir bien entre el gen *PKDI* y sus pseudogenes y existan dificultades para secuenciar dicho gen.

5.2.1. Preparación de librerías mediante la tecnología de amplicones para la región replicada (exones 1-34) del gen *PKDI*

Se desarrolló una estrategia basada en amplicones para amplificar la región replicada del gen *PKDI* (exones 1-34), que es la región con los seis pseudogenes, mediante la utilización de *primers* específicos que nos aseguren que estamos amplificando únicamente el gen *PKDI* y no los pseudogenes. Una vez generados dichos amplicones se prepara la librería con las condiciones adecuadas para ser secuenciada en una determinada plataforma de secuenciación (en este caso *Ion Torrent*) (Figura 12).



Figura 12. Flujo de trabajo desde la amplificación del DNA mediante PCR LR hasta que se prepara la librería para secuenciarla en la plataforma Ion Torrent.

La estrategia consiste en amplificar toda la región replicada del gen mediante 8 PCR LR. Las secuencias de los *primers* específicos que se utilizan para generar los amplicones se indican en la tabla 2:

Tabla 2. Secuencias de *primers* utilizados para la amplificación de la región replicada del gen *PKD1* mediante 8 PCR LR.

PCR-LR	Primers	Secuencia (5' 3')
T1 (Exón 1)	BPF14 BPR9	CCATCCACCTGCTGTGTGACCTGGTAAAT CCACCTCATCGCCCTTCCTAAGCAT
T2-T7 (Exones 2-7)	BPF9 BPR4	ATTTTTGAGATGGAGCTTCACTTGCAGG CGCTCGGCAGGCCCTAACCC
T8-T12 (Exones 8-12)	BPF12 BPR5b	CCGCCCCAGGAGCCTAGACG CATCCTGTTCATCCGCTCCACGGTTAC
T13-T15 (Exones 13-15)	F13 R27b	TGGAGGGAGGGACGCCAATC GTCAACGTGGGCCTCCAAGT
T15-T21 (Exones 15-21)	F26b TWR2	AGCGCAACTACTTGGAGGCC GCAGGGTGAGCAGGTGGGGCCATCCTAC
T22 (Exón 22)	BPF15 BPR12b	GAGGCTGTGGGGTCCAGTCAAGTGG AGGGAGGCAGAGGAAAGGGCCGAAC
T23-T28 (Exón 23-28)	BPF6 BPR6	CCCCGTCCTCCCGTCTTTTGTG AAGCGCAAAAGGGCTGCGTCG
T29-T34 (Exón 29-34)	28F KG8R25b	CCCTCTGCCCCCGCATTG GTTGCAGCCAAGCCCATGTTA

Para la preparación de las PCR LR se utilizaron los reactivos *FailSafe PCR 2X PreMix G*, *Biomix 2x* (Bioline®), *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*, *Taq DNA Polymerase* (Roche®), primer *forward* (concentración 20µM) y primer *reverse* (concentración 20 µM), reactivo *Q* (5M) (Quiagen®), *agua ultrapura* (MiliQ, Millipore®) y *Dimetilsulfóxido* (DMSO). Sin embargo las condiciones y reactivos utilizados para la generación de cada una de las PCRs fueron distintas. A continuación se indican las cantidades y reactivos para preparar la *mix* para cada amplicón.

LR T1 (exón 1): Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 3. Para cada muestra añadir 23µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 µl de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (MiliQ, Millipore®) en vez de DNA.

Tabla 3. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la PCR LR T1

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	7.5	22.5
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	1.25	3.75
Total	23	69

LT T2-T7 (exones 2-7) y LRT8-T12 (exones 8-12): Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 4. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100ng/µl aproximadamente, sino los µl_s necesarios para una cantidad de DNA de 100ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 µl. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Milipore®)* en vez de DNA.

Tabla 4. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la PCR LR T2-T7 y T8-T2

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>Biomix 2x (Bioline)</i>	12.5	37.5
reactivo <i>Q (5M) (Quiagen)</i>	5	15
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	5.1	15.3
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Taq DNA Polymerase (Roche)</i>	0.2	0.6
Total	24	72

LR T13-T15 (exones 13-15), LR T15-T21 (exones 15-21) y LR T23-T28 (exones 23-28): Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 5. Para cada muestra añadir 23µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 µl de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Millipore®)* en vez de DNA.

Tabla 5. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la PCR LR T2-T7 y T8-T2

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	8.75	26.25
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
Total	23	69

LR T29-T34 (exones 29-34): Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 6. Para cada muestra añadir 23µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 µl de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (*MiliQ*, *Milipore*®) en vez de DNA.

Tabla 6. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la mix para la LR T29-T34

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	7.5	22.5
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	1.25	3.75
Total	23	69

LT T22 (exón 22): Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 7. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100 ng/µl aproximadamente, sino los µl_s necesarios para una cantidad de DNA de 100 ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 µl. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (*MiliQ*, *Milipore*®) en vez de DNA.

Tabla 7. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la LR T22

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>Biomix 2x (Bioline)</i>	12.5	37.5
<i>Reactivo Q (5M) (Qiagen)</i>	5	15
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	5.3	15.3
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
Total	24	72

Las condiciones de amplificación también son distintas para las distintas PCR-LR. En la tabla 8 se especifican dichas condiciones:

Tabla 8. Condiciones para la amplificación de las PCR-LR

Amplificón	Programa PCR	Condiciones
T1	NWG4	94°C durante 2 minutos, seguido por 14 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 69°C durante 15 segundos con decrecimiento de 0.5°C por ciclo, and 68°C durante 6 min, luego seguido por 25 cycles de 94°C durante 15 segundos, 62°C durante 30 segundos and 68°C durante 6 minutos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T2-T7 T8-T12 T13-T15 T15-T21 T23-T28	LR DELTA	95°C durante 3 minutos, 80°C durante 3 minutos, seguido por 15 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 69°C durante 30 segundos con un decrecimiento de 0.5°C por ciclo, y 72°C durante 7 minutos, seguido luego por 20 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 64° durante 30 segundos y 72°C durante 7 minutos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T22	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 72°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T29-T34	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 6 minutos y 6 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Para chequear que la amplificación se produjo correctamente se corren los productos de PCR en gel de agarosa al 1%. A continuación se purifican mediante *AMPure XP Bead (Beckman Coulter®)* siguiendo *Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit (Life*

Technologies®). Seguidamente se cuantifican los amplicones utilizando el fluorímetro *Qubit 3.0*, utilizando los reactivos BR (*Broad Range*).

Posteriormente, se prepara un pool equimolar con los 7 amplicones (todos menos la LRT22) de 100ng en un volumen final de 130 µl que se fragmenta en fragmentos entre 150-180pb en el sonicador *Covaris® S2 System* (*Covaris*®) siguiendo las condiciones descritas en la tabla 12 del protocolo *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Solid 5500 Multiplexed Sequencing* (*Agilent Technologies*®).

Para preparar el pool equimolar es necesario tener en cuenta la concentración de los amplicones y el tamaño (pb) que se indican en la tabla 9. Se fragmentan todos los amplicones menos el T22 porque tiene un tamaño pequeño en comparación a todos los demás y la fragmentación es poco eficiente en amplicones pequeños mientras que sí lo es en aquellos de mayor tamaño.

Tabla 9. Tamaño de los amplicones

Amplicón	Primers	pb
T1	BPF14-BPR9	2272
T2-T7	BPF9-BPR4	4602
T8-T12	BPF12-BPR5b	4171
T13-T15	F13-R27b	4390
T15-T21	F26b-TWR2	3379
T22	BPF15-BPR12	345
T23-T28	BPF6-BPR6	4221
T29-T34	28F-KG8R25b	6110

Terminada la fragmentación se procede a la selección por tamaño de los fragmentos siguiendo el protocolo *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Solid 5500 Multiplexed Sequencing* (*Agilent Technologies*®) y se valida dicha selección

en el TapeStation 2200 utilizando reactivos de alta sensibilidad (figura 13).

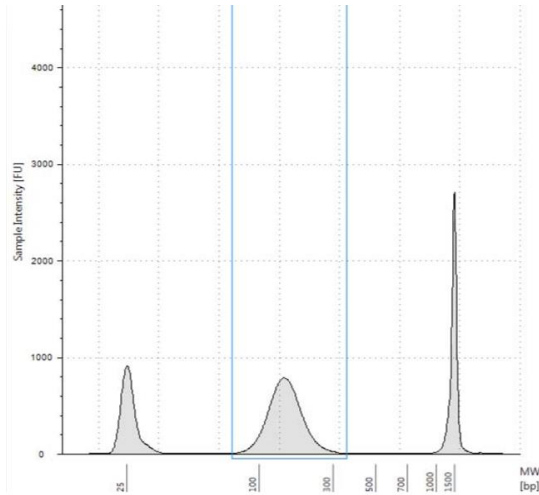


Figura 13. Perfil obtenido de la validación de la selección por tamaño utilizando el TapeStation 2200. El electroferograma muestra fragmentos de DNA de un tamaño medio de 150pb (imagen adaptada del protocolo *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Solid 5500 Multiplexed Sequencing (Version A1, August 2015, Agilent Technologies)*).

A continuación, se añade en la proporción equimolar el amplicón T22 y seguidamente se procede a la reparación de los extremos de los fragmentos y a la unión de adaptadores y *barcodes* siguiendo las indicaciones del protocolo *Ion XpressTM Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies®)* para un *input* de 100ng. A pesar de que el protocolo sólo indica una purificación mediante *AMPure XP Bead (Beckman Coulter®)*, se hace una doble purificación con el objetivo de eliminar todos los dímeros de adaptadores que no se conseguirían eliminar sólo con la primera purificación. Se validan las librerías utilizando el TapeStation 2200 y reactivos de alta sensibilidad y se cuantifican mediante qPCR siguiendo el protocolo *Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies®)*.

5.2.2. Preparación de librerías mediante la tecnología de amplicones para los genes PKD1, PKD2 y GANA β

Una vez que se desarrolló el protocolo para la región replicada de *PKD1*, y debido a que la parte del protocolo que eleva el coste es la generación de la librería para secuenciarla mediante NGS y no la generación de los amplicones, se pensó en extender esta estrategia a los tres genes, conocidos hasta el momento, asociados a ADPKD. Esto implica incrementar el número de PCR_s generadas (mínimo coste) pero preparar igualmente una sola librería para los 3 genes y por tanto poder diagnosticar a cualquier paciente con sospecha de ADPKD.

El flujo de trabajo para generar la librería es igual a lo explicado anteriormente en el apartado 5.2.1. En resumen, hay que generar los amplicones, purificarlos y cuantificarlos, fragmentarlos mediante *Covaris® S2 System (Covaris®)*, realizar la selección por tamaño, añadir el amplicón T22, realizar la reparación de extremos y la unión de adaptadores y la cuantificación de las librerías mediante qPCR. La diferencia está en el número de amplicones. Si en vez de realizar los amplicones únicamente para la región replicada del gen *PKD1* se hace para el gen entero, además de los 8 amplicones ya descritos en el apartado 5.2.1 se preparan 3 más (T35-T39, T40-T43 y T44-T46). El gen *PKD2* se amplifica mediante otras 8 PCR- LR y el gen *GANA β* mediante 5 PCR-LR.

En las tablas 10, 11 y 12 indico las secuencias de los *primers* que utilizamos para preparar las PCR.

Tabla 10. Secuencias de *primers* utilizados para la amplificación de la región no replicada del gen *PKD1* mediante 3 PCR LR.

PCR-LR	Primers	Secuencia (5' 3')
T35-T39 (Exones 35-39)	35F	GGGTCTCTGGTGGCCGCTCA
	39R	ATGCCAGAGCTCCGCTAAAGG
T40-T43 (Exones 40-43)	40F2	CTGGCATCAGCCCTGCTCCC
	43R	TCTGTCTGCTTGCAGCCCTGGGGTGTG
T44-T46 (Exones 44-46)	44F	GCCTCGCTGCTCTTCTCTG
	46R1	CCCTCCTGCACTGGCCTTGG

Tabla 11. Secuencias de *primers* utilizados para la amplificación del gen *PKD2*.

PCR-LR	Primers	Secuencia (5' 3')
T1 (Exon 1)	NGS_1F	GTGGAGACAGAAGCCAACCAAAGAG
	NGS_1R	GGATGCGAGATGGAGCCCG
T2 (Exones 2)	NGS_2F	TTTCTTTCCATTGCAATGTTTCATT
	NGS_2R	GGAAGATAGTCAATAAACAAATGCCAA
T3-T4 (Exones 3-4)	3,4F	AAACAATGGCTTGCCCATGT
	3,4R	GTGGGAGTTCAGAGAATAAATGAATG
T5-T6 (Exones 5-6)	IF1C	CGGTCAAGTGTCCACTGAT
	IR8	TTGTAGAATAGAATAGGAAATTTGG
T7-T8 (Exones 7-8)	7,8F	AACACTTCCATTGAGTGAGTGACT
	IR10	CTACTCTGACTAAATTTTCTTCTT
T9-T10 (Exones 9-10)	9,10F	CAAGACTTTGTAATGGGATTGACA
	9,10R	GAAAATCTGGGTGAAACAATGCT
T11-T13 (Exones 11-13)	11,13F	TTGAATGGCCAATGTACACCA
	IR4	AAATTCTGCCAATTCCTTTA
T14-T15 (Exones 14-15)	14,15F	CATCCGAGAGTTAATCTGTAAAGCTTG
	14,15R	CAGCCCTGTGCTTAAAGGCT

Tabla 12. Secuencias de *primers* utilizados para la amplificación del gen *GANAB*.

PCR-LR	Primers	Secuencia (5' 3')
T1 (Exon 1)	1F	TCTAAATAAAATTTGCCAACTTGAGAAA
	1R	AAGAGACACACAGGAAGGAGTGG
T2-T5 (Exones 2-5)	2,5FSeq	TCTAGTGCTATGACAGGAAGAAGCTT
	2,5R	AAAGAATATCAGCAACCAAAAAAAGG
T6-T11 (Exones 6-11)	6,11F2	GGGAGACGGAGGTTGCC
	6,11R2	GGAACCTCAAATGCTGCCAC
T12-T19 (Exones 12-19)	12,19F	AGAGGCCCGTTTAGTCTTACC
	12,19R	AGCTCCCCTTCACTCTTGACC
T20-T25 (Exones 20-25)	20,25F2	TGGCTCACTGAATGCACTCC
	20,25R2	GGTCTGTGGCTCAGGCTAGAAC

Para la preparación de las PCR LR se utilizaron los reactivos *FailSafe PCR 2X PreMix G*, *Biomix 2x* (Bioline®), *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*, primer *forward* (20µM) y primer *reverse* (20µM), reactivo *Q* (5M) (Quiagen®), *agua ultrapura* (MiliQ, Millipore®) y *Dimetilsulfóxido* (DMSO). Las condiciones y reactivos utilizados para la generación de cada una de las PCRs fueron distintas. A continuación se indican las cantidades y reactivos para preparar la *mix* para cada amplicón:

LR T35-T39 (exones 35-39) y LR44-T46 (exones 44-46) del gen *PKDI*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 13. Para cada muestra añadir 23µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 µl de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (MiliQ, Millipore®) en vez de DNA.

Tabla 13. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la LR T35-T39 y LR T44-T46

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
<i>Agua ultrapura</i> (MiliQ, Millipore)	8.75	26.25
<i>Primer forward</i> (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
<i>Primer reverse</i> (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
Total	23	69

LR T40-T43 (exones 40-43) del gen *PKDI*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 14. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100ng/µl aproximadamente, sino los µl_s

necesarios para una cantidad de DNA de 100ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 μ l. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Milipore®)* en vez de DNA.

Tabla 14. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la LR T40-T43

Reactivo	Volumen para 1 reacción (μ l)	Volumen (en μ l) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>Biomix 2x (Bioline)</i>	12.5	37.5
reactivo <i>Q (5M) (Quiagen)</i>	5	15
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	4.05	12.15
<i>Primer forward (20μM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Primer reverse (20μM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	1.25	3.75
Total	24	72

LR T1 (exón 1) del gen *PKD2*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 15. Para cada muestra añadir 23 μ l de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 μ l de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Milipore®)* en vez de DNA.

Tabla 15. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la LR T1 del gen *PKD2*.

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
Agua ultrapura (<i>MiliQ</i> , <i>Millipore</i>)	7.5	22.5
Primer forward (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
Primer reverse (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
Dimetilsulfóxido (<i>DMSO</i>)	1.25	3.75
Total	23	69

LR T2 (exón 2), LR T5-T6 (exones 5-6), LR T7-T8 (exones 7-8), LR T9-T10 (exones 9-10) del gen *PKD2*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 16. Para cada muestra añadir 23µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 2 µl de la muestra de DNA correspondiente. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Millipore®)* en vez de DNA.

Tabla 16. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la *mix* para la LR T2, LR T5-T6, LR T7-T8 y LR T9-T10 del gen *PKD2*.

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
Agua ultrapura (<i>MiliQ</i> , <i>Millipore</i>)	8.75	26.25
Primer forward (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
Primer reverse (20µM) ([20uM])	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
Total	23	69

LR T3-T4 (exones 3-4), LR T11-T13 (exones 11-13) y LRT14-T15 (exones 14-15) del gen *PKD2*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 17. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100ng/µl aproximadamente, sino los µl_s necesarios para una cantidad de DNA de 100ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 µl. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (*MiliQ*, *Milipore*®) en vez de DNA.

Tabla 17. Reactivos necesarios para prepara la mix de la LR T3-T4, LR T11-T13 y LR T14-T15

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>Biomix 2x</i> (<i>Bioline</i>)	12.5	37.5
reactivo <i>Q</i> (5M) (<i>Quiagen</i>)	5	15
<i>Agua ultrapura</i> (<i>MiliQ</i> , <i>Millipore</i>)	5.3	15.3
<i>Primer forward</i> (20µM) ([20uM])	0.6	1.8
<i>Primer reverse</i> (20µM) ([20uM])	0.6	1.8
Total	24	72

LR T1 (exón 1), LR T12-T19 (exones 12-19) y LR T20-T25 (exones 20-25) del gen *GANAβ*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 18. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100ng/µl aproximadamente, sino los µl_s necesarios para una cantidad de DNA de 100ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 µl. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura* (*MiliQ*, *Milipore*®) en vez de DNA.

Tabla 18. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la mix de la LR T1, LR T12-T19 y LR T20-T25 del gen *GANAB*.

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>Biomix 2x (Bioline)</i>	12.5	37.5
reactivo <i>Q (5M) (Qiagen)</i>	5	15
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	5.3	15.3
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.6	1.8
Total	24	72

LR T2-T5 (exones 2-5) y LR T6-T11 (exones 6-11) del gen *GANAB*: Las condiciones para preparar la *mix* se indican en la tabla 19. Para cada muestra añadir 24µl de la *mix* en cada tubo de PCR y 1 µl de la muestra de DNA correspondiente (se añade 1µl de DNA si la concentración es de 100ng/µl aproximadamente, sino los µl_s necesarios para una cantidad de DNA de 100ng, el resto del volumen se completa con la *mix* hasta un volumen final de la PCR de 25 µl. En el caso del control negativo añadir el mismo volumen de *agua ultrapura (MiliQ, Millipore®)* en vez de DNA.

Tabla 19. Reactivos y cantidades necesarias para preparar la mix de la LR T2-T5 y LR T6-T11 del gen *GANAB*

Reactivo	Volumen para 1 reacción (µl)	Volumen (en µl) para 1 muestra + control negativo (+ exceso)
<i>FailSafe PCR 2X PreMix G</i>	12.5	37.5
<i>Agua ultrapura (MiliQ, Millipore)</i>	7.5	22.5
<i>Primer forward (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>Primer reverse (20µM) ([20uM])</i>	0.75	2.25
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i>	0.25	0.75
<i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i>	1.25	3.75
Total	23	69

Las condiciones de amplificación para los distintos amplicones se detallan a continuación:

Condiciones para PCR LR de la región no replicada (exones 35-46) del gen *PKD1* (tabla 20):

Tabla 20. Condiciones para amplificar el gen *PKD1*:

Amplicón	Programa PCR	Condiciones
T35-T39	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 51 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T40-T43	NWG2	95°C durante 2 min, seguido por 14 ciclos de 98°C durante 20 segundos, 69°C durante 15 segundos con una disminución de 0.5°C por ciclo, y 72°C durante 3 minutos, seguido luego por 25 ciclos de 98°C durante 20 segundos, 62°C durante 15 segundos, and 72°C durante 3 minutos, con una extensión final de 72°C durante 5 minutos.
T44-T46	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 58 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos

Condiciones para PCR LR del gen *PKD2* (tabla 21):**Tabla 21.** Condiciones para amplificar el gen *PKD2*.

Amplicón	Programa PCR	Condiciones
T1	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 64°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y 22 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T2	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 61°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 25 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T3-T4	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 49 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos
T5-T6	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos y 45 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos
T7-T8	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 4 minutos y 33 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos
T9-T10	LR EXON 1	95°C durante 3 min, 80°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 64°C durante 7 minutos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T11-T13	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos y 50 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos
T14-T15	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos y 18 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos

Condiciones para PCR LR del gen *GANAβ* (tabla 22):**Tabla 22.** Condiciones para amplificar el gen *GANAβ*.

Amplicón	Programa PCR	Condiciones
T1	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 24 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T2-T5	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 56 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T6-T11	LR DELTA	95°C durante 3 minutos, 80°C durante 3 minutos, seguido por 15 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 69°C durante 30 segundos con un decrecimiento de 0.5°C por ciclo, y 72°C durante 7 minutos, seguido luego por 20 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 64° durante 30 segundos y 72°C durante 7 minutos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T12-T19	PCR NESTED	95°C durante 3 min, seguido por 5 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos 42 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.
T20-T25	NWG2	95°C durante 2 min, seguido por 14 ciclos de 98°C durante 20 segundos, 69°C durante 15 segundos con una disminución de 0.5°C por ciclo, y 72°C durante 3 minutos, seguido luego por 25 ciclos de 98°C durante 20 segundos, 62°C durante 15 segundos, and 72°C durante 3 minutos, con una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Una vez que se han generado los amplicones con todas las condiciones previamente descritas, y de que mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% se haya comprobado que la amplificación ha sido correcta, se purifican y cuantifican utilizando el fluorímetro *Qubit 3.0* y reactivos BR (*Broad Range*). Posteriormente se genera el pool equimolar con los 24 amplicones (8 de la región replicada del gen *PKD1*, 3 de la región no replicada del mismo gen, 8 del gen *PKD2* y 5 del gen *GANAB*). Para ello hay que tener en cuenta el tamaño de los amplicones. El tamaño para las PCR-LR de la región replicada ya se ha descrito en la tabla. A continuación, en la tabla 23, se indican los tamaños para todos los demás amplicones.

Tabla 23. Tamaño de los amplicones

Amplicón	Primers	Pb
T35-T39 de <i>PKD1</i>	35F-39R	1869
T40-T43 de <i>PKD1</i>	40F2-43R	1586
T44-T46 de <i>PKD1</i>	44F-46R1	2290
T1 de <i>PKD2</i>	NGS_1F-NGS_1R	1359
T2 de <i>PKD2</i>	NGS_2F-NGS_2R	2407
T3-T4 de <i>PKD2</i>	3,4F-3,4R	2480
T5-T6 de <i>PKD2</i>	IF1C-IR8	3737
T7-T8 de <i>PKD2</i>	7,8F-IR10	4464
T9-T10 de <i>PKD2</i>	9,10F-9,10R	4251
T11-T13 de <i>PKD2</i>	11,13F-IR4	2830
T14-T15 de <i>PKD2</i>	14,15F-14,15R	3301
T1 de <i>GANAB</i>	1F-1R	401
T2-T5 de <i>GANAB</i>	2,5FSeq-2,5R	924
T6-T11 de <i>GANAB</i>	6,11F2-6,11R2	2851
T12-T19 de <i>GANAB</i>	12,19F-12,19R	2701
T20-T25 de <i>GANAB</i>	20,25F2-20,25R2	2901

A partir de aquí todo el protocolo se realiza siguiendo las mismas indicaciones que están descritas en el apartado 7.2.1 para obtener la librería con todos los amplicones para los 3 genes.

5.3 Preparación del pool de librerías para la secuenciación mediante la plataforma de secuenciación Ion Torrent

Tras haber preparado el *pool* equimolar de todas las librerías (concentración de 50 pM para las librerías HaloPlex y concentración de 25 pM para las librerías de amplicones) se procede a realizar la PCR en emulsión en el *Ion OneTouch 2* (Life Technologies®) siguiendo el protocolo *Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL* revisión 6.0. En esta PCR se forman gotas de aceite en un medio acuoso de forma que dentro de cada gota queda una única molécula de ADN y una ISP (Ion Sphere Particle) que actúa como soporte para la amplificación. En cada gota la secuencia de DNA será amplificada hasta recubrir la superficie de la misma (figura 14).

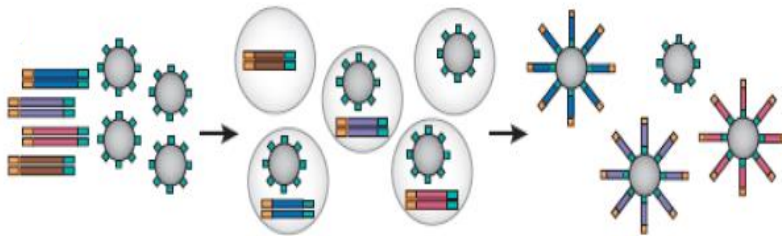


Figura 14. Esquema de la PCR de emulsión (figura adaptada del protocolo *Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL* revisión 6.0).

La calidad de la amplificación se evalúa utilizando el fluorímetro *Qubit 2.0* (Life Technologies®) y el kit *Ion Sphere Quality Control* (Life Technologies®). Se mide la razón entre dos fluoróforos *Alexa Fluor® 647* y *Alexa Fluor® 488* para evaluar la cantidad de DNA de la librería respecto al número de ISP.

Si la cantidad de ISP (*Alexa Fluor*® 488) es mucho mayor que la cantidad de DNA de interés (*Alexa Fluor*® 647) sabemos que hay muchas ISP sin producto; si ocurre lo contrario quiere decir que las ISP tienen mucho DNA y pueden ser policlonales (figura 15).

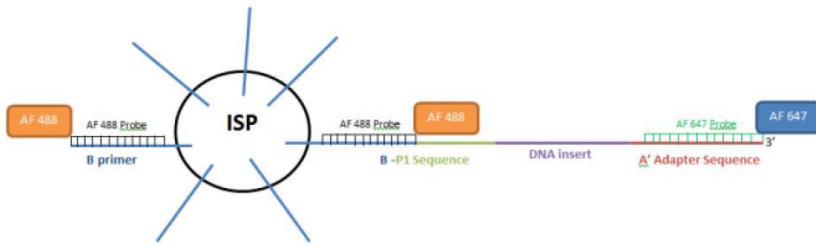


Figura 15. Esquema del ensayo de calidad de la amplificación de las Ion Sphere Particles (ISP) (figura adaptada del protocolo *Ion PGM™ template OT2 200 kit User Guide, Pub. No. MAN0007220 Rev. 4.0*).

Lo que interesa es mantener un equilibrio entre el número ISP y la cantidad de DNA, de tal forma que haya suficientes ISPs recubiertas con DNA pero que sean monoclonales, es decir que estén cargadas con moléculas de la misma secuencia. El ratio óptimo debe ser entre un 10-30%.

A continuación se realiza el enriquecimiento en el *Ion OneTouchES (Life Technologies®)*, para eliminar las ISPs que no tienen DNA y enriquecer la muestra en ISPs cargadas con DNA.

Finalmente, las ISPs enriquecidas son cargadas en el chip de forma manual.

Sin embargo, desde hace aproximadamente 2 años, en la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica se adquirió el *Ion Chef™ System*, que de forma automatizada hace todo el proceso anterior utilizando el kit *Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit (Life Technologies®)*.

5.4. Secuenciación mediante la plataforma Ion Torrent

La secuenciación mediante la plataforma de secuenciación Ion Torrent (secuenciadores *Ion PGM* e *Ion Proton*) (figura 16 y figura 17) es un tipo de secuenciación que no necesita ni de fluorescencia ni de luz para la detección, de tal forma que el nucleótido incorporado a la cadena se detecta directamente, lo que conlleva a un aumento en la velocidad de secuenciación y a una disminución de los costes.



Figura 16. Imagen del secuenciador Ion PGM (figura adaptada de <https://www.seqomics.hu>)



Figura 17. Imagen del secuenciador Ion Proton (figura adaptada de <https://allseq.com>)

Para llevar a cabo la secuenciación, las muestras se tienen que cargar en un chip semiconductor lleno de pocillos. En cada pocillo se va a depositar una ISP recubierta de DNA, de tal forma que sólo se puede depositar una ISP por pocillo. Durante el proceso de secuenciación, cada vez que un nucleótido es incorporado por la polimerasa se libera un protón que altera el pH del pocillo. Dicha alteración de pH induce un cambio en la superficie de la capa de detección de óxido de metal, y como consecuencia, un cambio en el potencial que va a ser detectado por un sensor de voltaje. Dicho cambio de voltaje se transmite a un ordenador como información digital. Si no se incorpora ningún nucleótido no se generará voltaje y si se incorporan dos nucleótidos iguales el voltaje generado será el doble. Es decir,

mediante la detección del cambio de pH el secuenciador detecta si el nucleótido se ha incorporado o no (figura 18).

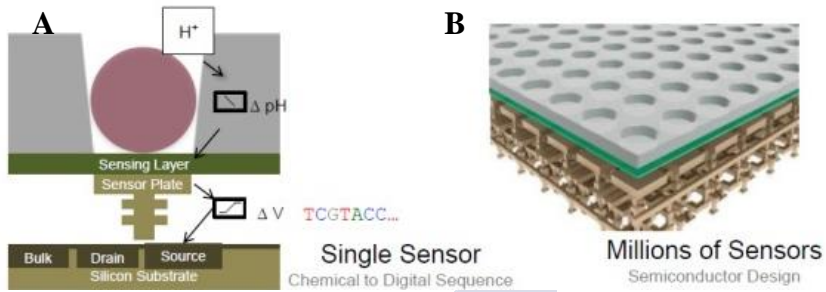


Figura 18. A) Esquema del proceso de secuenciación basada en semiconductores. B) Representación de la superficie del chip con los pocillos donde se cargará cada ISP recubierta de DNA. Por debajo se puede observar el sensor de pH (figura adaptada de <https://labmedicineblog.com>).

Los *pools* de las librerías se cargan en estos chips semiconductores que se introducen en el secuenciador para ser secuenciados. Existen 3 tipos de chips con distinta capacidad de lectura para el *Ion PGM* (*Ion 314 Chip Kit v2 BC*, *Ion 316 Chip Kit v2 BC* e *Ion 318 Chip Kit v2 BC*) y un chip para el *Ion Proton* (*Ion PITM Chip*) con gran capacidad de lectura.

Por tanto, para calcular la cantidad de secuencia que se genera en cada *pool* y elegir cuál de los chips se debe utilizar para secuenciar, hay que tener en cuenta: el número de muestras a secuenciar, el tamaño de la región de interés de cada diseño y la profundidad de lectura que se pretende conseguir, es decir, el número de veces que se quiere que una base sea leída.

El kit de secuenciación utilizado es el *Ion PGMTM IC 200 Kit* (*Life Technologies*®). Los paneles de HaloPlex 72 genes tienen una región de interés muy grande, por tanto para que el proceso de secuenciación sea coste/eficiente las muestras se secuenciaron en el *Ion Proton*, mientras que los paneles de 8

genes y 11 genes con menor región de interés se secuenciaron en el *Ion PGM*, al igual que las librerías preparadas mediante la tecnología de amplicones.

La diferencia en cuanto a la secuenciación entre las librerías *HaloPlex* y las librerías de amplicones radica en que estas últimas se tienen que secuenciar a 400pb (debido a que el amplicón T22 no se fragmenta y tiene un tamaño superior a las 300 pb). Por tanto, y debido a que el *Ion Proton* no permite secuenciar a 400pb, todas las librerías se secuencian en el *Ion PGM*.

Al planificar el *run* se carga en el secuenciador el archivo *bed*, que contiene las regiones de interés de cada uno de los diseños. Como secuencia de referencia se utiliza la secuencia de referencia del genoma humano GRCh37/hg19, de Febrero de 2009.

5.5. Análisis de los datos de secuenciación

Las secuencias son analizadas mediante el *Software Ion Torrent Suite*, utilizando el programa TMAP (*Torrent Mapping Alignment Program*) Smith–Waterman alignment optimization y TVC (*Torrent Variant Caller*). El análisis genera distintos archivos:

- Archivos que recogen las lecturas alineadas (archivos BAM, *Binary Alignment/Map*).
- Archivos que recogen las variantes detectadas (archivos VCF, *Variant Call Format*).
- Informe de todo el proceso de secuenciación, tanto para el conjunto de muestras como de forma individualizada por cada muestra.

Se utiliza el software ANNOVAR para la anotación de SNVs e INDELS.

Además tenemos generada en el laboratorio una base de datos (*Variant Counter*), donde se recogen todas las variantes identificadas en pacientes que nosotros hemos secuenciado, y que nos permite identificar las variantes muy comunes y recurrentes debidas a artefactos de la técnica.

5.6. Filtrado de las variantes

Una vez que todas las variantes han sido anotadas, se realiza un filtrado de las mismas siguiendo distintos criterios, con el objetivo de seleccionar aquella o aquellas variantes que se cree que pueden ser responsables del fenotipo asociado a la enfermedad. Para realizar este filtrado se tiene en cuenta:

- Variantes que pasan el filtro TVC: se seleccionan todas las variantes que pasan dicho filtro y se descartan las demás.
- Variantes exónicas y de *splicing*: se tienen en cuenta estas variantes, descartándose, *a priori*, el resto.
- Variantes no sinónimas: se tienen en cuenta todas las variantes no sinónimas y se descartan todas las sinónimas.
- Variantes que no aparezcan en muchos individuos de nuestra cohorte (utilizando para ello el *variant counter*)

A mayores se tienen en cuenta otros parámetros, como las frecuencias poblacionales, descartando las variantes frecuentes en la población (normalmente con frecuencias mayores del 1% en base a la información recogida en bases de datos de frecuencia mutacional como *gnomAD* o *1000Genome*) o predictores *in silico* de patogenicidad como *Dann*, *PolyPhen-2* o *MutationTaster 2*, entre otros.

6. Caracterización de las familias gallegas con ADPKD: Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (FIS2016-2018)”

En el año 2016 comenzó el Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (FIS2016-2018)”, que tiene como objetivo diagnosticar a las familias gallegas con ADPKD y establecer correlaciones genotipo/fenotipo con el objetivo de obtener un mejor conocimiento de la enfermedad y de sus manifestaciones extrarrenales. Se trata de un proyecto en el que se han involucrado todos los hospitales de referencia de Galicia, que desde Enero de 2016 remiten al laboratorio muestras de pacientes con sospecha de ADPKD. Se solicita que envíen al individuo probando, así como al mayor número posible de individuos afectados y no afectados de la familia, junto con el árbol genealógico correspondiente con el objetivo de hacer un diagnóstico en contexto familiar (diagnóstico genético en cascada).

La forma en la que se procede en el laboratorio para diagnosticar a las familias consiste en realizar el test genético (test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*), mediante la tecnología NGS al individuo probando de cada familia y una vez que se ha identificado la mutación causal asociada a la enfermedad, se valida dicha mutación en los demás individuos de la familia (sanos y afectados). Lo que se espera es que todos los individuos afectados de la familia porten la misma mutación mientras que los sanos no. En este caso se dice que la variante segrega con la enfermedad.

Es una estrategia que demostró ser coste/eficiente y que nos permite establecer el mapa gallego de enfermedad poliquística, así como estimar la prevalencia de la enfermedad en una población como la población gallega con ADPKD.

7. Análisis estadístico para la correlación genotipo-fenotipo en el Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente - PI15/01467 (FIS2016-2018)”.

Para la realización del análisis estadístico se utiliza el programa IBM SPSS Statistics. Para determinar el ajuste a la normalidad de las variables numéricas se utiliza el test de Kolmogorov-Smirnov, con la corrección de Liliefors.

Como las muestras que manejamos son independientes, para contrastar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se utiliza el test T de Student si la variable es paramétrica. En caso contrario se utiliza la Û de Man-Whitney.



RESULTADOS. PARTE 1

Estrategias de diagnóstico para enfermedad quística renal hereditaria

En este trabajo se utilizan dos tecnologías distintas, ambas basadas en la Secuenciación de Nueva Generación (NGS), como métodos de diagnóstico de PKD. Una de ellas se basa en el diseño de paneles de genes mediante la tecnología HaloPlex y la segunda es una estrategia basada en amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*, genes asociados a ADPKD, enfermedad renal más común. Hemos analizado a distintas cohortes de pacientes mediante los paneles de genes y mediante la estrategia de amplicones, incluso combinando ambos, y lo que buscamos es identificar cual es el método más eficiente para diagnosticar a los pacientes con ADPKD.

1. Diagnóstico genético mediante paneles de genes utilizando la tecnología HaloPlex.

Para diagnosticar a los pacientes con enfermedad renal quística hereditaria hemos establecido 2 grupos (3 paneles de genes) en base a la incidencia poblacional de los genes asociados a la enfermedad.

1. Panel con los 8 genes más comunes asociados a la enfermedad que cubre un total de 108624pb (*diseñado y publicado en la tesis de Lisbeth Sousa*).

2. Panel con los 11 genes más comunes asociados a la enfermedad que cubre un total de 126661pb. Este panel incluye los 8 genes anteriores, pero aprovechando la versatilidad que aportan estas tecnologías, que permiten ir incorporando en los diseños más genes a medida que se van identificando, hemos realizado este segundo diseño en donde además de incluir los 8 genes anteriores incorporamos 3 más asociados a las formas comunes de PKD.
3. Panel con los 72 genes asociados a las formas comunes, raras y ultra-raras de la enfermedad que cubre un total de 688932pb (*diseñado y publicado en la tesis de Lisbeth Sousa*).

1.1. Diseño de los paneles y coberturas *in silico*.

En la tabla 24 se representan las condiciones con las que se han realizado cada uno de los diseños. Para los tres paneles se han considerado como regiones de interés las regiones codificantes de todos los genes incluidos en cada diseño y las regiones UTRs de cada gen, así como 50pb de regiones flanqueantes. Así mismo, también se representan las coberturas *in silico* promedio para todos los genes de cada diseño. En el anexo 2 se indican las coberturas *in silico* para cada uno de los genes de cada diseño.

Tabla 24. Características de cada diseño *in silico*

Panel	UTRs	Región Flanqueante (bp)	Región Diana (bp)	Cobertura <i>In Silico</i> (IX)
Panel para enfermedad renal quística común (8 genes)	Si	50	108624	98.5%
Panel para enfermedad renal quística común (11 genes)	Si	50	126661	98.29%
Panel para enfermedad renal quística común, rara y ultra-rara (72 genes)	Si	50	688932	99.1%

Como se observa en la tabla 24, la cobertura *in silico* promedio obtenida para todos los genes de cada diseño fue superior al 98%, lo que significa que se cubre la mayoría de los genes, a excepción de pequeñas regiones que se denominan regiones perdidas. La herramienta de diseño *online* de HaloPlex genera un archivo donde se indica que regiones del diseño no están bien cubiertas.

Mediante herramientas de visualización, como *UCSC Genome Browser* o *IGV (Integrative Genomics Viewer)*, se puede visualizar, del toda la región de interés, cuáles son las regiones que están cubiertas y cuáles son las que se pierden (Figura 19).

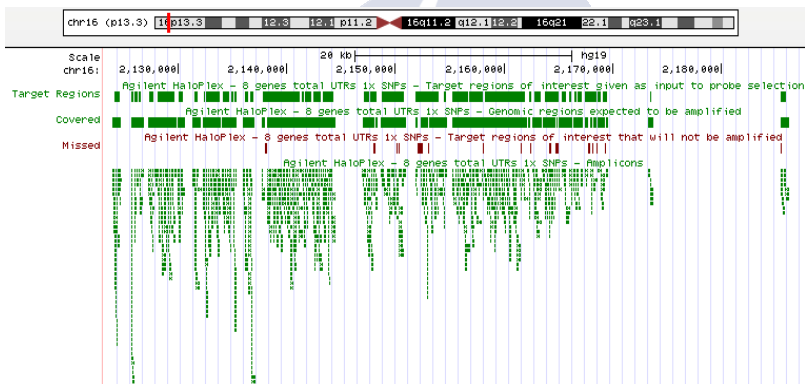


Figura 19. Representación, mediante *UCSC Genome Browser*, de las regiones cubiertas y las perdidas para el gen *PKD1* mediante el panel de 8 genes.

1.2. Construcción de las librerías

El primer paso, previo a la generación de las librerías, consiste en chequear la integridad de los DNAs a utilizar mediante gel de agarosa al 1% (figura 20). Como se puede observar en la figura, ninguno de los DNAs estaba degradado y, por tanto se podía proceder a preparar la librería.

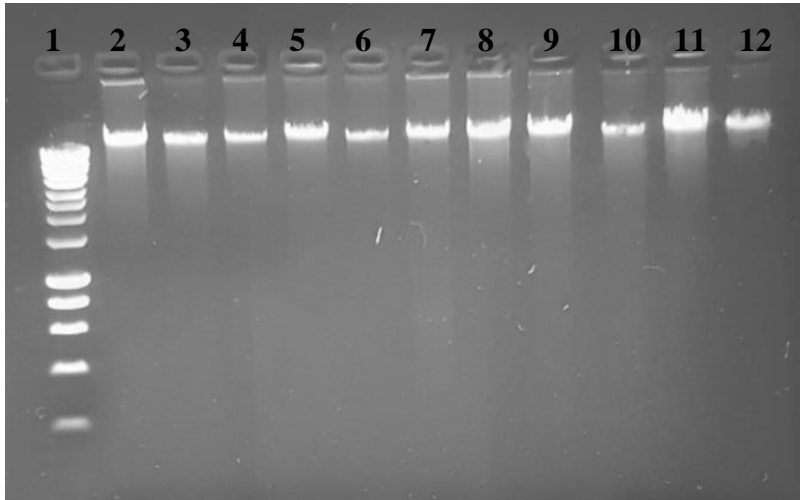


Figura 20. Gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular *Hyperladder I*, (Bioline) y en los carriles 2-12 las muestras DNA. Se puede observar que ninguna de las muestras está degradada

Como se describió en el apartado de material y métodos, a lo largo de todo el proceso de construcción de las librerías se realizan dos validaciones para comprobar que el proceso se va realizando correctamente. La primera validación se realiza utilizando el *TapeStation 2200* para comprobar que la digestión con los 8 pares de enzimas de restricción se ha producido correctamente. Se chequea el control y se asume que si el control de DNA se ha digerido bien también se han digerido bien las muestras.

La segunda validación también se realiza utilizando la misma plataforma pero en este caso se valida la librería una vez que ha terminado todo el proceso, con el objetivo de chequear si el perfil de la librerías obtenido es el correcto y cuantificar su concentración. En la figura se muestra el perfil para una de las muestras, ya que todos resultaron ser muy similares. Se cuantifican las librerías teniendo en cuenta el área comprendida entre 150-550 pb. Además también se cuantifica el pico que

aparece a 125 pb que corresponde a dímeros de cebadores y debe ser inferior al 10% de la concentración de la librería. Si no es así habría que repetir la última purificación utilizando *Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter)*.

1.3. Secuenciación de las librerías e informe del *run* de secuenciación

Diferentes muestras se pueden secuenciar mediante la tecnología Ion Torrent en un único chip y *run*. Sin embargo debemos tener en cuenta que HaloPlex solo cuenta con 16 *barcodes* y por tanto el número máximo de muestras que se pueden secuenciar en un chip es 16. El número de librerías a secuenciar en cada chip depende de la capacidad de lectura del chip, del tamaño de las librerías a secuenciar y de la profundidad de lectura que pretendamos obtener.

Como resultado de la secuenciación, la plataforma genera automáticamente un informe donde se recogen diferentes parámetros de calidad que nos permiten conocer como funcionó la secuenciación para todo el conjunto de muestras así como también para cada muestra de forma individual.

A continuación, se van a explicar dichos parámetros en base a un informe obtenido de un pool de librerías preparadas para el diseño de 11 genes que se secuenciaron en el *Ion PGM* en un chip *Ion 316™ Chip*.

La densidad de carga hace referencia al número de pocillos que contienen en su interior una *Ion Sphere Particle (ISP)*. Viene representada por una escala de colores (el rojo indica una densidad de carga elevada mientras que el azul representa una baja densidad de carga). En este caso se obtuvo una muy buena densidad de carga, un 96% (Figura 21).

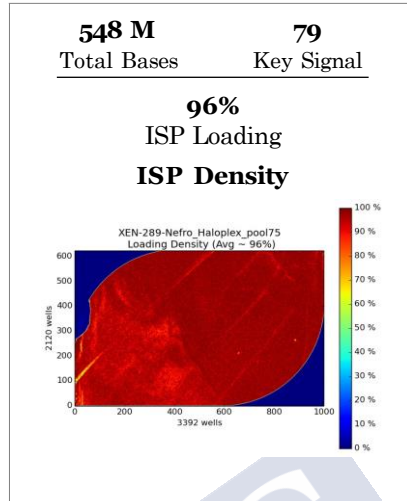


Figura 21: Total de bases leídas, *Key Signal* y densidad de carga de un *Ion 316™ Chip*.

Otro parámetro dado por el informe es el *Key Signal*, parámetro de calidad que tiene su límite inferior en 30. Mide el número de fragmentos por *Ion Sphere Particle* (ISP) o la eficiencia de reacción de preparación de los fragmentos. En este caso se obtuvo un valor de 79 (muy bueno) (Figura 21), pero este parámetro varía en función de la versión del *Software Torrent Suite*.

En cuanto al número de lecturas, el valor obtenido fue 3.676.756, de las cuales un 61% (valor que se encuentra dentro del rango normal) fue útil para el análisis de las secuencias (Figura 22).

En la figura 22 también se tiene información en cuanto al porcentaje de enriquecimiento, es decir, porcentaje de *Ion Sphere Particles* que hay en el chip que tiene DNA. En este caso se obtuvo un 100% de enriquecimiento, lo que indica que se seleccionaron bien las *ISP* con fragmentos y se eliminaron aquellas que no los tenían.

La policlonalidad de las ISP es otro parámetro muy interesante. Interesa que cada *Ion Sphere Particle* quede recubierta por copias del mismo fragmento de DNA, ya que sólo las monoclonales son útiles para la secuenciación. Los valores óptimos de policlonalidad están entre el 10-40%, un valor superior al 40% indicaría que hay muchas ISP policlonales y un valor inferior al 10% que hay muy pocas ISP cargadas. En este ejemplo el porcentaje obtenido fue un 32%, dentro del rango esperado. Además, el 89% de las ISP están cargadas con DNA de la librería y un 0% corresponde a ISP del control de calidad (*test fragment*). El 6% de las secuencias leídas corresponden a dímeros de cebadores y el 5% de las *Ion Sphere Particles* tienen baja calidad (Figura 22).

La longitud media de las lecturas es otro parámetro a destacar. Dicha valor fue de 149pb, parámetro que también entra dentro de la normalidad (Figura 23). Además al observar la gráfica (Figura 23) se ve que tiene un perfil similar al de las librerías validadas en *TapeStation 2200*, aunque en este caso ya se han eliminado los cebadores y los datos de baja calidad.

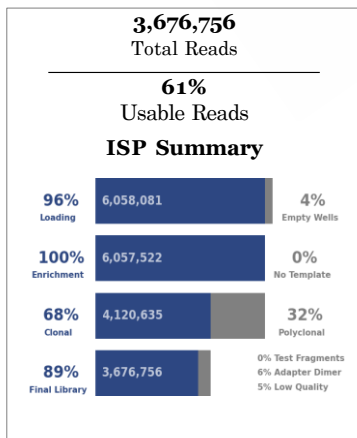


Figura 22. Gráfico que resume el estado de las ISP durante la secuenciación.

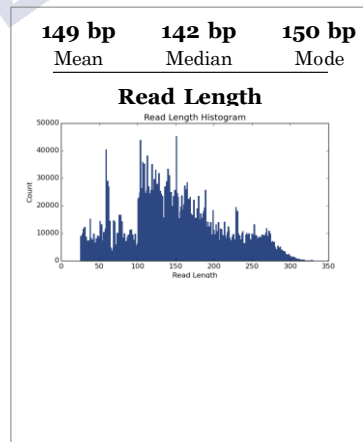


Figura 23. Gráfica que representa la longitud de las lecturas durante la secuenciación.

A mayores de todos los parámetros anteriores que aportan información sobre la secuenciación para todo el conjunto de muestras, el informe también aporta un resumen de las lecturas de cada muestra. En la tabla 24 los *barcodes* hacen referencia a la secuencia de oligonucleótidos de secuencia conocida asignados a cada muestra. Se muestra el tamaño medio de las lecturas por cada muestra/*barcode*, así como el número de bases leídas, el número de lecturas realizadas y el número de bases que tienen un *score* de calidad mayor o igual a Q20.

Los *scores* Q se relacionan, de forma logarítmica, con la probabilidad de error en la secuenciación. Para el score Q20 la probabilidad de lectura incorrecta es 1:100. Para las muestras que se observan en la tabla 24 el número de bases que pasa dicho control es muy elevado, indicando, por tanto, una buena calidad de secuenciación.

Tabla 25. Parámetros específicos para cada muestra

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	MeanRead Length
No barcode	none	23,551,635	21,107,300	179,097	131 bp
Haloplex 01	3281	55,004,617	52,641,275	361,672	152 bp
Haloplex 02	3455	70,525,728	67,578,946	470,381	149 bp
Haloplex 03	3479	51,813,971	49,659,360	342,458	151 bp
Haloplex 04	3488	57,107,131	54,715,492	366,370	155 bp
Haloplex 05	3489	52,175,654	49,975,367	351,498	148 bp
Haloplex 06	3499	52,454,388	50,135,621	358,357	146 bp
Haloplex 08	3426	59,905,991	57,289,590	396,067	151 bp
Haloplex 09	3393	54,382,760	52,042,535	373,092	145 bp
Haloplex 10	3539	71,551,712	68,339,174	477,058	149 bp

Como se observa en la tabla 25, el número de bases leídas es elevado en todos los casos, correspondiendo los valores más altos a los *barcodes* 2 y 10 y siendo bastante uniformes en todos los demás casos.

El tamaño medio de las lecturas varía dependiendo del kit de secuenciación utilizado. En el caso de estas librerías, así como de todas las librerías generadas mediante la tecnología *HaloPlex*, el tamaño esperado sería de 200 pb. En ningún casos

se llegó a obtener dicho valor sino que siempre se obtienen valores un poco menores al esperado, en torno a 150 pares de bases. Sin embargo también se observa que los valores son uniformes para todas las muestras. Se considera que estos resultados entran dentro de la normalidad (tabla 25).

Además, el *report* aporta un resumen del alineamiento que indica el porcentaje de bases que se alinearon con el genoma de referencia. En este caso el 98% se alinearon con la secuencia de referencia hg19 del genoma humano (figura 24).

Por tanto, el informe muestra que de los 548 millones de leídas 513 millones se alinearon con respecto a la secuencia de referencia. El 2% de las secuencias no se alinean, las cuales corresponden a secuencias de pequeño tamaño que probablemente corresponde a los cebadores. En la parte derecha de la figura se observa la precisión de la secuenciación. En este caso fue de un 99.7% (muy buena) (figura 24).

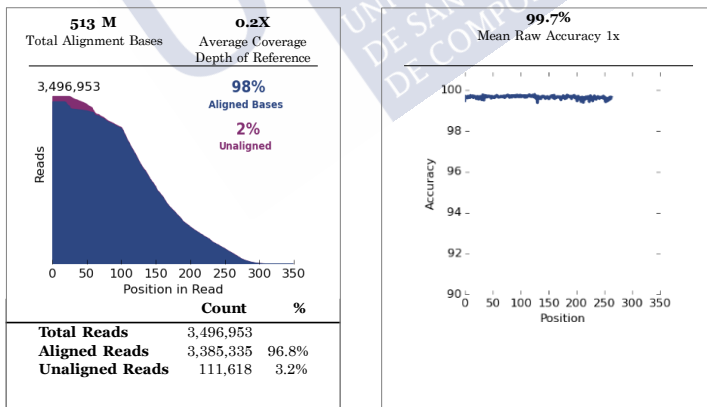


Figura 24. Resumen del alineamiento y calidad de las lecturas

El último parámetro hace referencia a la secuenciación del fragmento de prueba (*test fragment*) incluido en el experimento.

El *report* nos indica el número de lecturas que contienen este fragmento de prueba. El porcentaje 50AQ17 representa el número de lecturas del *test fragment* con un tamaño mínimo de 50 pb de longitud y una tasa de error de 1 en 50. Se obtuvo un porcentaje del 94%, el cual es muy bueno (figura 25).


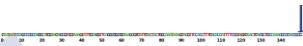
Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF C	1,367	94	
TF 1	10,365	96	

Figura 25. Parámetros de calidad del fragmento de prueba

1.4. Análisis de cobertura real de los paneles

Finalizado el proceso de secuenciación y tras el análisis informático se obtiene el cálculo del porcentaje de las regiones diana que fueron capturadas por el diseño (más 20pb de región flanqueante) y que fueron cubiertas como mínimo por 30 lecturas ($\geq 30X$). Con esta información se calcula el porcentaje de cobertura media y máxima de cada uno de los genes incluidos en el diseño y se puede comparar además con el porcentaje de cobertura *in silico* del diseño. Sin embargo, la cobertura *in silico* nos aporta el porcentaje de región cubierta por lo menos una vez (1X).

Además se obtienen los valores de profundidad de lectura media (*mean target coverage*). En cuanto a la profundidad de lectura, los resultados fueron variables, ya que esto depende del número de muestras secuenciadas por chip, de la capacidad de lectura del chip y del tamaño de la región de interés de cada panel. De forma general, un incremento en la profundidad de lectura se correlaciona con un aumento en los porcentajes de cobertura máxima real. Consideramos como correcta las muestras con una

profundidad de lectura media superior a 100X. En el caso de que este valor fuese menor se vuelve a secuenciar la librería.

A continuación se indican los resultados de cobertura para cada uno de los paneles utilizados en este trabajo.

1.4.1. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común de 8 genes

Las profundidades de lectura reales para las muestras secuenciadas mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes variaron entre 133X-638X, siendo la profundidad media de lectura 212X. Las coberturas reales máximas promedio para los 8 genes del diseño resultaron superiores al 97% (a excepción del gen *PKD1*), lo que significa que más del 97% de la región diana de los genes de interés fueron leídas como mínimo 30 veces ($\geq 30X$). El porcentaje de cobertura promedio para todos los genes fue superior al 88% en todos los genes a excepción de *PKD1*, en donde el valor obtenido fue el 60%.

En la tabla 26 se indican los porcentajes de cobertura reales obtenidos, tanto máximos como el promedio para cada uno de los genes.

Tabla 26. Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común de 8 genes.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura Máxima ($\geq 30X$)	% Cobertura Promedio ($\geq 30X$)
<i>HNF1B</i>	17	9	1854	100	94.8
<i>PKD1</i>	16	46	13829	87.8	60.0
<i>PKD2</i>	4	15	3207	99.3	94.1
<i>PKHD1</i>	6	67	13545	100	100.0
<i>PRKCSH</i>	19	17	1898	100	88.1
<i>SEC63</i>	16	21	2703	100	94.6
<i>TSCI</i>	9	23	3915	100	96.8
<i>TSC2</i>	16	42	6244	97.5	89.8

1.4.2. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común de 11 genes

Las profundidades de lectura reales para las muestras secuenciadas mediante el panel de enfermedad quística común de 11 genes variaron entre 177X-334X, siendo la profundidad media de lectura 257X. Las coberturas reales máximas promedio para los 11 genes del diseño resultaron superiores al 97%, al igual que en el panel de 8 genes (a excepción de los genes *PKDI* y *UMOD*), lo que significa que más del 97% de la región diana de los genes de interés fueron leídas como mínimo 30 veces ($\geq 30X$). El porcentaje de cobertura promedio para todos los genes fue superior al 94% en todos los genes a excepción de *PKDI* y *UMOD*, en donde el valor obtenido fue el 78% y 79%, respectivamente.

En la tabla 27 se indican los porcentajes de cobertura reales obtenidos, tanto máximos como el promedio para cada uno de los genes.

Tabla 27. Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común de 11 genes.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura Máxima ($\geq 30X$)	% Cobertura Promedio ($\geq 30X$)
<i>GANAB</i>	11	25	3401	100	99.6
<i>HNF1B</i>	17	9	1854	100	99.5
<i>MUC1</i>	1	9	1608	80.8	79.4
<i>PKDI</i>	16	46	13829	83.5	78.2
<i>PKD2</i>	4	15	3207	99.0	97.1
<i>PKHD1</i>	6	67	13545	99.5	99.4
<i>PRKCSH</i>	19	17	1898	100	99.1
<i>SEC63</i>	16	21	2703	100	94.5
<i>TSCI</i>	9	23	3915	100	98.2
<i>TSC2</i>	16	42	6244	97.1	96.7
<i>UMOD</i>	16	11	2242	99.0	97.7

1.4.3. Análisis de cobertura para el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes

Las profundidades de lectura reales para las muestras secuenciadas mediante el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes variaron entre 369X-2044X, siendo la profundidad media de lectura 857X. Las coberturas reales máximas promedio para los 72 genes del diseño resultaron superiores al 85% (a excepción del gen *PKDI*), lo que significa que más del 85% de la región diana de los genes de interés fueron leídas como mínimo 30 veces ($\geq 30X$). El porcentaje de cobertura promedio para todos los genes fue superior al 84% en todos los genes a excepción de *PKDI*, en donde el valor obtenido fue el 76%.

En la tabla 28 se indican los porcentajes de cobertura reales obtenidos, tanto máximos como el promedio para cada uno de los genes.

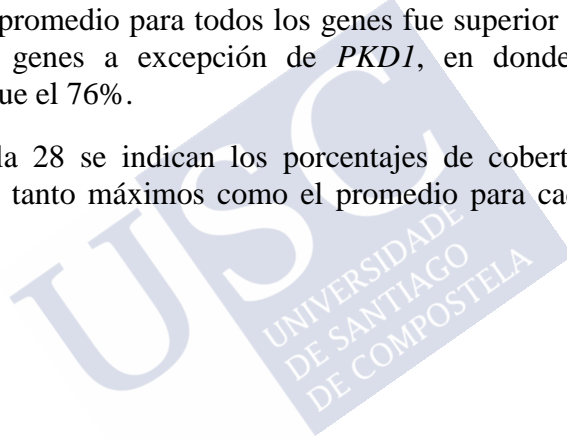


Tabla 28. Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura Máxima (≥30X)	% Cobertura Promedio (≥30X)
AHI1	6	26	4111	99.7	95.6
ALMS1	2	23	12964	98.1	97.0
ARL13B	3	10	1487	100	99.4
ARL6	3	8	742	85.7	84.9
B9D1	17	7	755	100	99.7
B9D2	19	3	588	100	100
BBS1	6	17	2122	100	99.9
BBS10	12	2	2212	97.2	97.1
BBS12	4	2	4306	100	100
BBS2	16	17	2506	100	98.6
BBS4	15	16	1880	90.0	89.3
BBS5	2	12	1266	100	99.9
BBS7	4	19	2528	100	98.3
BBS9	7	22	3104	100	99.1
CC2D2A	4	36	5583	99.0	98.1
CEP290	12	53	8500	95.9	92.0
CEP41	7	11	1342	100	99.4
DNAH11	7	82	15191	98.1	96.2
DNAH5	5	79	15455	100	99.2
DNAI1	9	20	2500	100	99.6
DNAI2	17	13	2210	97.6	96.9
DYNC2H1	11	90	14745	99.5	96.3
EVC	4	21	3399	92.8	90.9
GLIS2	16	6	1695	100	99.9
GUCY2D	17	18	3672	99.2	99.0
HIF1A	14	15	2781	99.5	99.5
HNF1B	17	9	1858	100	99.2
IFT80	3	19	2714	99.8	97.3
INPP5E	9	10	2135	98.1	97.8
INVS	9	16	3518	99.8	98.5
IQCB1	3	13	2057	100	96.2
KIF7	15	18	4392	95.8	94.6
LZTFL1	3	10	1100	100	99.9
MKKS	20	4	1973	100	99.1
MKS1	17	18	2040	100	99.8
NEK1	4	34	4541	99.0	97.0
NEK8	17	15	2379	100	99.9
NME8	7	15	2067	98.0	96.6
NPHP1	2	20	2602	100	99.8
NPHP3	3	27	4533	100	97.9
NPHP4	1	29	4861	96.7	96.5
OFD1	X	23	3499	99.7	99.0
PKD1	16	46	13829	81.3	76.6
PKD2	4	15	3207	99.0	98.6
PKHD1	6	67	13545	99.5	98.6

Continuación tabla

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura Máxima (≥ 30X)	% Cobertura Promedio (≥ 30X)
PRKCSH	19	17	1898	99.5	97.4
RP1	8	3	6531	98.0	97.3
RPE65	1	14	1882	100	100
RPGR	X	19	2828	97.6	94.7
RPGRIPL	16	26	4468	99.0	94.5
RSPH4A	6	6	2271	100	96.6
RSPH9	6	6	1041	100	100
SDCCAG8	1	20	3961	100	99.3
SEC63	16	21	2703	100	96.9
SEPT7	7	13	1572	99.1	99.0
TCTN1	12	14	2002	100	99.9
TCTN2	12	18	2454	99.2	95.6
TMEM138	11	4	569	100	100
TMEM216	11	5	538	100	100
TMEM237	2	12	1443	96.8	96.8
TMEM67	8	28	3548	99.9	98.4
TRIM32	9	2	1982	100	100
TSC1	9	23	3915	98.5	96.6
TSC2	16	42	6244	96.0	94.7
TTC21B	2	29	4531	98.7	96.7
TTC8	14	15	1848	100	94.3
UMOD	16	12	2242	96.3	93.3
VHL	3	3	702	100	91.8
WDPCP	2	18	2601	96.9	95.2
WDR19	4	36	4749	99.7	99.3
WDR35	2	28	4106	98.0	96.2
XPNPEP3	22	10	1724	100	100

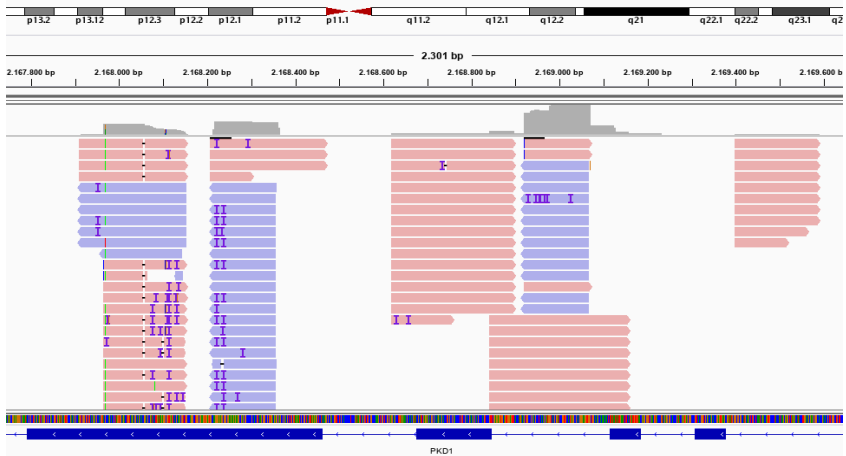
1.4.4. Análisis de cobertura para el gen PKD1 mediante la tecnología HaloPlex

Si se realiza el cálculo de coberturas promedio para todos los exones del gen *PKDI* se observa que los porcentajes más bajos de cobertura proceden de la región replicada (exones 1-34), independientemente del diseño (8 genes, 11 genes o 72 genes). En la región no replicada (exones 35-46) los porcentajes de cobertura obtenidos en la mayoría de las muestras son superiores al 90%.

Tras el análisis de secuenciación se obtiene un archivo BAM que se puede cargar en un visualizador de genomas como el IGV, y que permite observar el número de lecturas en cada posición.

En la figura 26a se observa la visualización con el IGV para una muestra (ID: 3281), secuenciada mediante el panel de enfermedad quística común de 11 genes y para los exones 2-5 del gen (fragmento de la región no replicada). Se puede ver que hay varias regiones exónicas con baja cobertura (menos de 30 lecturas). Por el contrario, en la figura 26b se visualiza el número de lecturas en los exones 35-39 (fragmento de la región no replicada del gen). Incluso en las regiones exónicas que tienen menor cobertura el número de lecturas es superior a 30.

A)



B)

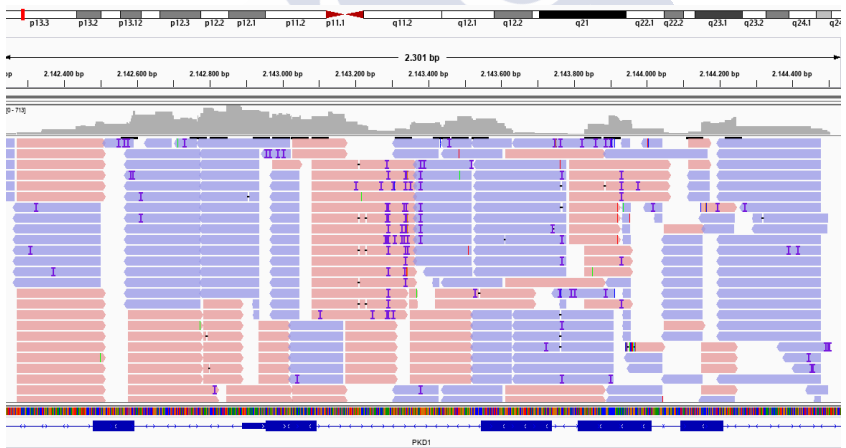


Figura 26. Visualización en IGV de las lecturas de una muestra (ID: 3281) diagnosticada con el panel de 11 genes. A) Visualización de las lecturas en los exones 2-5 de la región replicada del gen *PKD1*. B) Visualización de las lecturas en los exones 35-39 de la región no replicada del gen *PKD1*.

2. Diagnóstico genético mediante la estrategia de amplicones

Los paneles HaloPlex, tienen como inconveniente que no son capaces de capturar exclusivamente el gen *PKDI*. El gen *PKDI* tiene 6 pseudogenes con una alta homología de secuencia (aproximadamente el 98%), y las sondas HaloPlex no son capaces de discernir entre *PKDI* y los pseudogenes. Como consecuencia de esto esta tecnología no es capaz de cubrir bien el gen y se genera una alta tasa de falsos positivos (con el panel se detectan variantes que al validarlas mediante otro método de secuenciación como, por ejemplo, la secuenciación por sanger resultan negativas) y lo que es peor, genera falsos negativos). Con el objetivo de solucionar este problema se desarrolló una estrategia basada en amplicones que consiste en amplificar el gen mediante PCR-LR, utilizando *primers* específicos y posteriormente, con esos productos de PCR preparar las librerías para que puedan ser secuenciadas mediante la tecnología NGS.

En un principio se desarrollaron los amplicones para la región replicada del gen *PKDI* (exones 1-34) ya que es la región que contiene los pseudogenes y es la región de baja cobertura mediante los paneles HaloPlex. Sin embargo, vimos que la única diferencia entre hacer sólo esta región en vez de secuenciar el gen *PKDI* entero (exones 1-46) o incluso más genes es el número de PCR-LR que se requieren, ya que independientemente del número de PCRs el número de librerías que se van a preparar va a ser una por cada paciente. Esto nos llevó a aplicar la estrategia no sólo al gen *PKDI*, sino también a los genes *PKD2* y *GANAB*, con el objetivo de diagnosticar mediante esta estrategia todos los casos de ADPKD, ya que eran los tres genes asociados a la enfermedad conocidos en ese momento, y la propia estructura de los genes nos permitió aplicar la tecnología.

2.1. Generación de las librerías

El primer paso para la preparación de las librerías es amplificar el gen mediante PCR-LR utilizando los *primers* que se describen en el apartado de material y métodos, siguiendo las condiciones allí descritas. Para comprobar que se han amplificado las regiones correctas se corren las PCR-LR en geles de agarosa al 1%. En la figura 27 se observa, a modo de ejemplo, las PCRs T5-T6 del gen *PKD2* para distintas muestras.

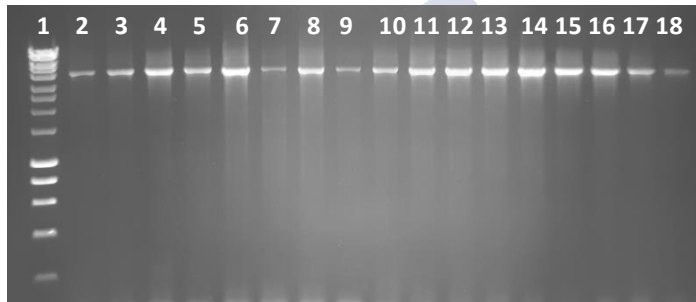


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para las PCR-LR T5-T6 del gen *PKD2* para distintas muestras de pacientes (carriles 2-18). En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular *Hyperladder I*, *Biorline*.

Como se describió en el apartado de material y métodos, a lo largo del protocolo se realizan varias validaciones para comprobar que el proceso de generación de las librerías se va produciendo correctamente.

La primera validación se realiza utilizando el *TapeStation 2200* y reactivos de alta sensibilidad tras fragmentar las muestras utilizando el sonicador *Covaris® S2 System* (*Covaris®*). En la figura 28 se muestra el perfil esperado tras la fragmentación.

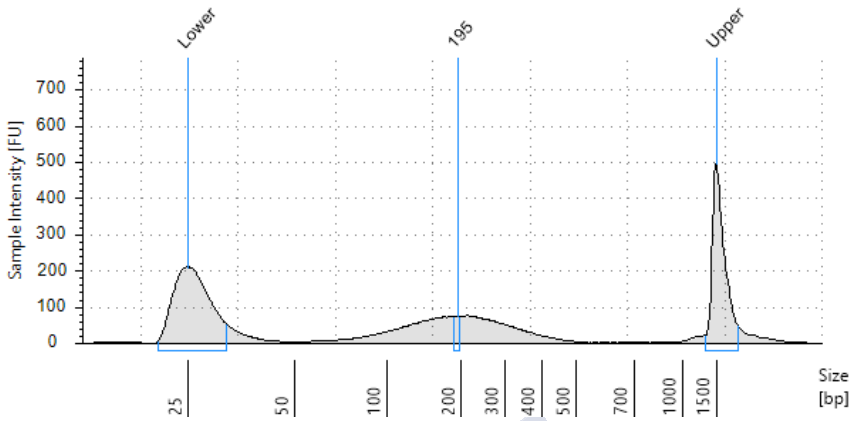


Figura 28. Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200* tras la fragmentación de los amplicones utilizando el *Covaris® S2 System (Covaris®)*.

La segunda validación se lleva a cabo, también mediante la plataforma *TapeStation 2200* utilizando reactivos de alta sensibilidad, tras la realización de la selección por tamaño siguiendo el protocolo *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Solid 5500 Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies)*. Se espera un tamaño de los fragmentos en torno a 150pb (figura 29).

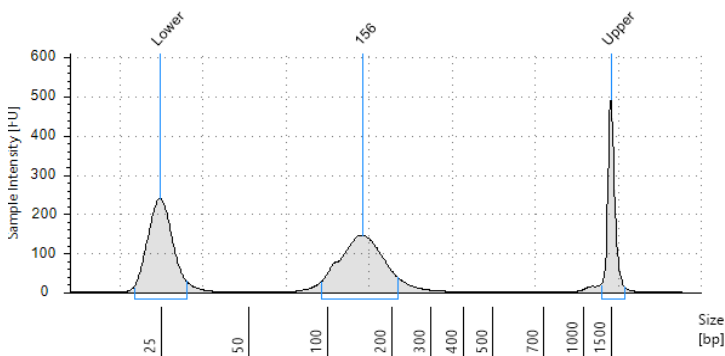


Figura 29. Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200* tras la realización de la selección por tamaño utilizando beads *AMPure XP (Beckman Coulter Genomics)*.

La última validación se produce tras la unión de adaptadores y *barcodes*, cuando ya se ha terminado la librería, con el objetivo de comprobar que el perfil de la librería final es el esperado y poder cuantificar su concentración utilizando el *TapeStation 2200* y reactivos de alta sensibilidad. En el electroferograma (figura 30) se observa un tamaño medio de los fragmentos en torno a 200pb y también se observa una especie de “cola” o pequeños fragmentos en 400pb que corresponden al amplicón T22 que no se había fragmentado pero que se añadió tras la selección por tamaño, y que por tanto está incluido en la librería y tiene que aparecer representado.

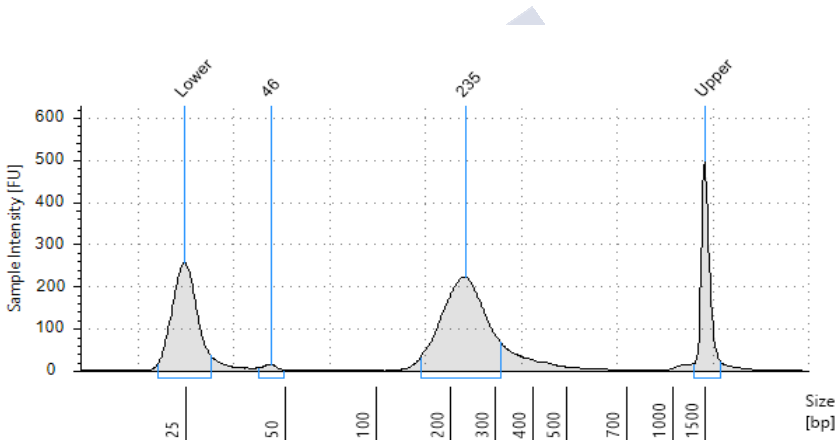


Figura 30. Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200*. Se observa el perfil de la librería final con un tamaño de los fragmentos en torno a 200pb.

2.2. Secuenciación de las librerías mediante la plataforma Ion Torrent e informe del *run* de secuenciación

Diferentes muestras se pueden secuenciar en un único chip y *run*. Hay disponibles hasta 96 *barcodes*, por tanto el número de barcodes no es limitación. Todas las librerías se secuencian en el secuenciador *Ion PGM*, ya que hay que secuenciar las librerías a 400 pb y el *Ion Proton* no lo permite. Elegimos el tipo de chip que vamos a utilizar en función del número de muestras que se

quieran secuenciar, así como de la región que estamos a secuenciar (solo región replicada del gen *PKD1* o gen *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*) y la profundidad de lectura que se quiera obtener.

Como resultado de la secuenciación, la plataforma genera automáticamente un informe donde se recogen diferentes parámetros de calidad que nos permiten conocer como funcionó la secuenciación para todo el conjunto de muestras que secuenciamos en el chip, así como también para cada muestra de forma individual.

A continuación, se van a explicar dichos parámetros en base a un informe obtenido de un pool de librerías preparadas para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* que se secuenciaron en el *Ion PGM* en un chip *Ion 318™ Chip*.

La densidad de carga hace referencia al número de pocillos que contienen en su interior una *Ion Sphere Particle* (ISP). En este caso se obtuvo una buena densidad de carga, un 86% (Figura 31).

El Key Signal es un parámetro de calidad que tiene su límite inferior en 30. Se obtuvo un valor de 75 (muy bueno) (Figura 31), pero este parámetro varía en función de la versión del *Software Torrent Suite*.

En cuanto al número de lecturas, el valor obtenido fue 5.515.626, de las cuales un 57% (valor que se encuentra dentro del rango normal) fue útil para el análisis de las secuencias (Figura 31).

En la figura 31 también se tiene información en cuanto al porcentaje de enriquecimiento. En este caso se obtuvo un 100% de enriquecimiento, lo que indica que se seleccionaron bien las *ISP* con fragmentos y se eliminaron aquellas que no los tenían.

La policlonalidad de las ISP es otro parámetro muy interesante. En este ejemplo el porcentaje obtenido fue un 35%, dentro del rango esperado. Además, el 87% de las ISP están cargadas con DNA de la librería y un 0% corresponde a ISP del control de calidad (*test fragment*). El 0% de las secuencias leídas corresponden a dímeros de cebadores y el 13% de las *Ion Sphere Particles* tienen baja calidad (Figura 31).

El valor obtenido para la longitud media de las lecturas fue de 153pb, parámetro que también entra dentro de la normalidad (Figura 31). Además al observar la gráfica (Figura 31) se ve que tiene un perfil similar al de las librerías validadas en *TapeStation 2200*, aunque en este caso ya se han eliminado los cebadores y los datos de baja calidad.

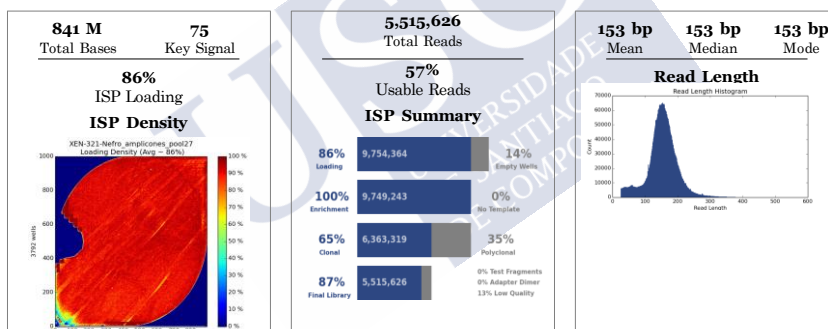


Figura 31. Representación de distintos parámetros dados por el informe de secuenciación para evaluar el proceso

A mayores de todos los parámetros anteriores que aportan información sobre la secuenciación para todo el conjunto de muestras, el informe también aporta un resumen de las lecturas de cada muestra. Se muestra el tamaño medio de las lecturas por cada muestra/*barcode*, así como el número de bases leídas, el número de lecturas realizadas y el número de bases que tienen un *score* de calidad mayor o igual a Q20 (tabla 27).

Tabla 29. Parámetros específicos para cada muestra

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	24,810,311	22,777,690	156,626	158 bp
IonXpress 056	3377	31,911,818	29,666,890	217,148	146 bp
IonXpress 057	3374	58,010,228	53,957,279	374,315	154 bp
IonXpress 058	3387	34,016,903	31,563,450	224,585	151 bp
IonXpress 059	3232	40,974,135	38,027,342	277,850	147 bp
IonXpress 060	3190	51,107,573	47,129,328	336,647	151 bp
IonXpress 061	2782	38,542,572	35,696,966	248,443	155 bp
IonXpress 062	2867	29,371,586	27,166,565	191,708	153 bp
IonXpress 063	3002	42,080,340	38,954,521	266,218	158 bp
IonXpress 064	3177	28,667,448	26,495,319	182,994	156 bp
IonXpress 081	3188	32,793,987	30,341,640	216,211	151 bp
IonXpress 082	3189	34,316,992	31,831,720	229,721	149 bp
IonXpress 083	3228	38,867,915	35,643,753	268,042	145 bp
IonXpress 084	3229	25,822,634	23,905,271	167,748	153 bp
IonXpress 085	3233	24,128,085	22,144,666	158,897	151 bp
IonXpress 086	3235	26,232,226	24,366,112	181,203	144 bp
IonXpress 087	3305	23,968,035	22,314,332	159,016	150 bp
IonXpress 088	3373	31,332,476	29,045,101	208,570	150 bp
IonXpress 089	3376	48,868,091	45,226,216	325,713	150 bp
IonXpress 091	1890	32,662,200	30,414,699	219,789	148 bp
IonXpress 092	3568	17,317,277	16,006,094	116,540	148 bp
IonXpress 093	3575	23,300,150	21,543,482	166,000	140 bp
IonXpress 095	3824	56,519,163	51,881,290	316,635	178 bp
IonXpress 096	3868	45,749,808	42,650,828	303,498	150 bp

En la tabla 29 se observa que el número de bases leídas es elevado en todos los casos, siendo por lo general bastante uniformes.

El tamaño medio de las lecturas varía dependiendo del kit de secuenciación utilizado. En el caso de estas librerías de amplicones el tamaño esperado sería de 200 pb. En ningún caso se llegó a obtener dicho valor sino que siempre se obtienen valores un en torno a 150 pares de bases, que es bastante menos de los esperado, pero es un valor que siempre ha salido igual en todos los chips secuenciados (tabla 27).

Además, el *report* aporta un resumen del alineamiento que indica el porcentaje de bases que se alinearon con el genoma de referencia. En este caso el 84% se alinearon con la secuencia de referencia hg19 del genoma humano (figura 32).

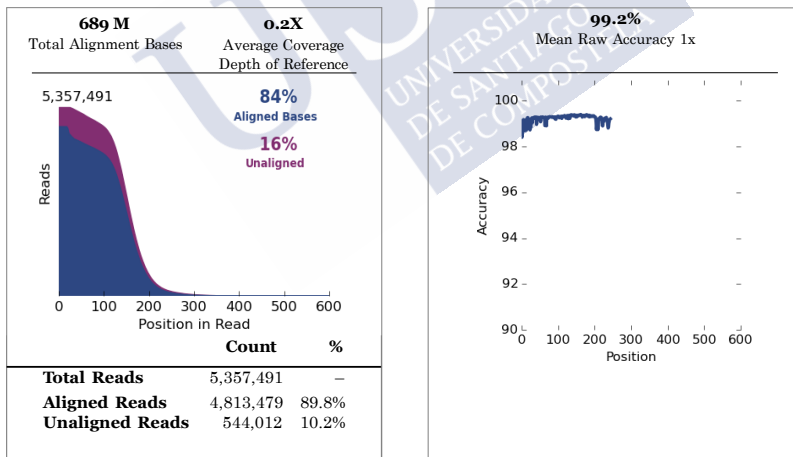


Figura 32. Resumen del alineamiento y calidad de las lecturas

Por tanto, el informe muestra que de los 841 millones de leídas 689 millones se alinearon con respecto a la secuencia de referencia. El 16% de las secuencias no se alinean. En la parte

derecha de la figura se observa la precisión de la secuenciación. En este caso fue de un 99.2% (muy buena) (figura 32).

Además también se obtiene, por cada muestra la profundidad de lectura y el número de lecturas que mapean en la región diana (tabla 30)

Tabla 30. Representación de la profundidad de lectura para cada muestra y del número de lecturas que mapean en la región diana

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
IonXpress_056	3377	186,367	100.00%	375.3	86.40%
IonXpress_057	3374	330,431	100.00%	705.7	88.23%
IonXpress_058	3387	201,424	100.00%	414.3	91.19%
IonXpress_059	3232	249,697	100.00%	487.5	97.75%
IonXpress_060	3190	302,880	100.00%	600.3	96.80%
IonXpress_061	2782	233,062	100.00%	479.1	95.10%
IonXpress_062	2867	177,007	100.00%	359	97.68%
IonXpress_063	3002	242,167	100.00%	474.2	97.70%
IonXpress_064	3177	165,356	100.00%	353.8	87.41%
IonXpress_081	3188	194,535	100.00%	384.5	97.49%
IonXpress_082	3189	207,002	100.00%	403.4	90.98%
IonXpress_083	3228	251,543	100.00%	496.9	97.43%
IonXpress_084	3229	153,957	100.00%	312.9	90.73%
IonXpress_085	3233	148,040	100.00%	305.5	95.86%
IonXpress_086	3235	167,375	100.00%	328	96.24%
IonXpress_087	3305	129,967	100.00%	259.2	91.70%
IonXpress_088	3373	192,373	100.00%	385.1	92.20%
IonXpress_089	3376	284,088	100.00%	558.3	97.81%
IonXpress_091	1890	190,769	100.00%	387.3	97.98%
IonXpress_092	3568	104,237	100.00%	206	96.00%
IonXpress_093	3575	146,191	100.00%	280.5	97.65%
IonXpress_095	3824	285,782	100.00%	700	96.87%
IonXpress_096	3868	269,209	100.00%	559.9	97.80%

2.3. Análisis de cobertura

Se analizó la cobertura por cada exón y se calculó la cobertura máxima y media por cada exón y por cada gen, de forma que cada una de las bases esté leída como mínimo 30 veces ($\geq 30X$). Independientemente de que en las librerías sólo se incluya la región replicada del gen *PKD1* o se incluya el gen *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*, en condiciones óptimas, mediante esta estrategia se consigue cubrir toda la región codificante de los genes de interés al 100% (tabla 31).

Tabla 31. Resultados de los porcentajes de cobertura obtenidos mediante la estrategia de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura Máxima ($\geq 30X$)
<i>PKD1</i>	16	46	13829	100
<i>PKD2</i>	4	15	3207	100
<i>GANAB</i>	11	25	3401	100

3. Establecimiento de la estrategia de diagnóstico más adecuada para diagnosticar a una población PKD.

Mediante la combinación de las estrategias de las que se dispone (descritas anteriormente), nos propusimos buscar aquella que es más coste efectiva para diagnosticar a una cohorte de pacientes ADPKD. Una de las estrategias se basa en diagnosticar a los pacientes mediante la tecnología HaloPlex y en el caso de que el resultado sea negativo se le realiza el test de amplicones para la región replicada del gen *PKD1* (estrategia diagnóstica 1). La segunda estrategia se basa en utilizar el test de amplicones para los tres genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* como primera estrategia diagnóstica y en caso negativo se realizan los paneles HaloPlex (estrategia diagnóstica 2).

3.1. Análisis de variantes mediante la estrategia de diagnóstico 1 (paneles de genes haloplex + amplicones para la región replicada del gen *PKDI*)

Se basa en utilizar los paneles de genes HaloPlex como primera estrategia diagnóstica. En el caso de que el resultado sea genético sea negativo, y sabiendo que la región replicada del gen *PKDI* no se cubre bien mediante estos paneles, se haría la estrategia de amplicones para dicha región con el objetivo de cubrirla al 100% y asegurar un diagnóstico certero. A continuación se resume la eficiencia diagnóstica conseguida mediante la combinación de ambas estrategias.

A) Diagnóstico de una cohorte de pacientes con sospecha clínica de PKD y solicitud de diagnóstico mediante el panel para enfermedad quística común de 8 genes:

Se analizó a una cohorte de 81 individuos (casos índice) mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

Todos los pacientes fueron remitidos al laboratorio para la realización del test genético para enfermedad quística común. La información que nosotros conocemos *a priori* de la cohorte de estudio es que 61 pacientes (75.3%) presentaban sospecha clínica de PKD, 6 pacientes (7.4%) de ARPKD, 4 (5%) de esclerosis tuberosa y de los 10 pacientes restantes (12.3%) no conocemos ningún tipo de información acerca de cuál es la enfermedad de base de la que sospecha el clínico.

Tras haber realizado el test genético, se puede concluir que de los 61 pacientes que presentaban sospecha clínica de PKD, en 26 de ellos (42.6%) se identificaron variantes que cumplen criterios de patogenicidad y que podrían justificar un fenotipo asociado a ADPKD. En concreto, 12 casos (46.2%) eran portadores de variantes patogénicas en el gen *PKDI*, 11 (42.3%) en el gen *PKD2*, en 1 caso (3.8%; ID: 2034) se produjo una

interacción génica entre los genes *PKD2* (se identifica una variante de *splicing* clasificada como patogénica) y *SEC63* (se identifica una variante de significado incierto que los predictores *in silico* de patogenicidad clasifican como deletérea) y en los 2 casos restantes (7.7%) (hermanos, ID: 2002 y 2003) se produjo una interacción génica entre los genes *PKD1* (identificada una delección de tipo *frameshift*) y *PKD2* (se identifica una inserción *nonframeshift*). Además en 2 pacientes de los 61 (3.3%) se identificaron dos variantes en el gen *PKHD1*, que podrían justificar un fenotipo asociado a ARPKD, mientras que, por el contrario, en 3 casos (4.9%) solamente se identificó una variante en dicho gen en cada paciente, por lo que estos 3 casos se clasifican como inconclusos. En otro paciente (1.6%) se identificó una variante de significado incierto que cumple criterios de patogenicidad en el gen *TSC1* asociado a esclerosis tuberosa tipo I. Por último, en los 29 casos restantes (47.6%) no se encontró ninguna variante que cumpliera criterios de patogenicidad que pudiese estar asociada a algún tipo de enfermedad, clasificando estos casos como negativos para el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

Por tanto, y en resumen para la cohorte de 61 pacientes con sospecha clínica de PKD, se obtuvo un diagnóstico genético positivo (es decir, casos en los que se identificaron variantes probablemente patogénicas que pueden justificar el fenotipo asociado a la enfermedad) en el 47.5% de los casos (n=29), siendo concordante en diagnóstico clínico con el genético en el 96.6% (n=28). En 3 (4.9%) el diagnóstico genético fue inconcluso y el 47.6% restante de los casos fueron negativos.

En la tabla 32 se muestran las variantes identificadas en todos los pacientes que se pudieron diagnosticar mediante el panel de 8 genes y a mayores, se incluye la variante identificada en los pacientes con diagnóstico genético inconcluso (ID: 1958, 2280 y 2413).

Tabla 32. Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de PKD diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zygosity
1906	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon15:c.G6152A:p.R2051H					T	B		N		het
2451	exonic	PKD1	nonframeshift deletion	PKD1:NM_000296:exon36:c.10707_10712del:p.3569_3571del										het
2493	splicing	PKD1		PKD1:NM_000296:exon19:c.7489+2T>G					.	.	.	D	0.988	het
262	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon15:c.C4103T:p.A1368V					T	D	D	D		het
275	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon15:c.6727_6728del:p.Q2243fs										het
459	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon15:c.G6100A:p.G2034R					D	D	D	D		het
543	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon15:c.T5213G:p.L1738R					D	D	D	N		het
921	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon23:c.G8311A:p.E2771K					D	D	D	D		het
1636	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon46:c.C12445T:p.R4149C					D	D	D	D		het
2036	exonic	PKD1	stopgain SNV	PKD1:NM_000296:exon8:c.G1663T:p.G555X					T			A		het
2063	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon24:c.8898delG:p.E2966fs										het
2267	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon29:c.9782A>G:p.H3261R					D	D	D	D		het
2067	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C								D		het
2093	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon13:c.2419C>T:p.R807X					T			A		het
2143	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C								D		het
2282	exonic	PKD2	nonsynonymous SNV	PKD2:NM_000297:exon10:c.2081A>G:p.Q694R					T	B	B	D		het
2411	exonic	PKD2	frameshift insertion	PKD2:NM_000297:exon11:c.2152dupA:p.L171fs										het
2549	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon2:c.596-1G>A								D	0.995	het
13	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon4:c.916C>T:p.R306X					T			D		het
268	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C								D		het
301	exonic	PKD2	stopgain SNV	PKD2:NM_000297:exon4:c.C916T:p.R306X					T			D		het
1236	exonic	PKD2	frameshift deletion	PKD2:NM_000297:exon13:c.2433_2434del:p.811_812del										het
1537	exonic	PKD2	nonsynonymous SNV	PKD2:NM_000297:exon5:c.A1301G:p.N434S					D	D	D	D		het
2034	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C					.	.	.	D		het
2034	exonic	SEC63	nonsynonymous SNV	SEC63:NM_007214:exon13:c.C1279A:p.L427I					D	D	D	D		het
2002	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon35:c.10524_10525del:p.3508_3509del										het
2002	exonic	PKD2	nonframeshift insertion	PKD2:NM_000297:exon1:c.288_289insGAG:p.A96delinsAE										het
2003	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon35:c.10524_10525del:p.3508_3509del										het
2003	exonic	PKD2	nonframeshift insertion	PKD2:NM_000297:exon1:c.288_289insGAG:p.A96delinsAE										het
1997	exonic	PKHD1	stopgain SNV	PKHD1:NM_138694:exon23:c.C2341T:p.R781X								A		het
1997	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon9:c.A664G:p.I222V						P	B	N		het
2392	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon37:c.6116T>C:p.L2039P				0	D	D	D	D		het
2392	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon50:c.8012G>C:p.R2671P					D	P	P	N		het
2219	exonic	TSC1	nonsynonymous SNV	TSC1:NM_000368:exon15:c.1922C>A:p.P641H	Untested				D	D	D	D		het
1958	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon34:c.5411delG:p.R1804fs					D	D	D	N		het
2280	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon32:c.C5099T:p.T1700I					D	D	D	D		het
2413	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon44:c.7028A>C:p.Y2343S					T	D	D	D		het

Después de haberle realizado la prueba genética a los 6 pacientes con sospecha clínica de ARPKD, se concluye que 4 de los pacientes (66.6%) resultaron positivos. En 2 de ellos se identificaron interacciones génicas entre los genes *HNF1 β* y *TSC* y en los otros 2 se identificaron dos variantes en el gen *PKHD1* que cumplen criterios de patogenicidad y que pueden justificar el fenotipo asociado a la enfermedad. Un paciente resultó inconcluso (16.7%), porque únicamente se identificó una variante de significado incierto en el gen *PKHD1* tras la realización del test genético y otro (16.7%) resultó negativo, no identificándose ninguna variante patogénica que se pudiese asociar a enfermedad. En la tabla 33 se muestran las variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de ARPKD y estudiados mediante el panel genético de 8 genes.

Entre los pacientes con sospecha clínica de esclerosis tuberosa, el estudio genético reveló que el 50% (n=2) fueron positivos, identificándose en los dos casos la variante probablemente patogénica en el gen *TSC2* asociado a esclerosis tuberosa tipo II. El 50% restante (n=2) resultó negativo para la prueba. En la tabla 34 se muestran las variantes identificadas en los dos pacientes con sospecha clínica de esclerosis tuberosa y con un diagnóstico genético concordante con la patología de base.

Por último, para la cohorte de los 10 pacientes para los cuales no conocemos cuál es la sospecha clínica, mediante el test genético se identifican variantes probablemente patogénicas asociadas a ADPKD en 3 casos (30%). En concreto, 2 pacientes son portadores de variantes en el gen *PKD1* y 1 en el gen *PKD2*. En 1 paciente (10%) se identifica la variante probablemente asociada a la enfermedad en el gen *TSC2* y los demás 6 casos (60%) resultaron negativos para el estudio genético. En la tabla 35 se muestran las variantes identificadas para los 3 casos de ADPKD y para el paciente diagnosticado genéticamente de esclerosis tuberosa tipo II.

Tabla 33. Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de ARPKD diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AAChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_Pred	Polyphen2_HVAR_Pred	MutationTaster_Pred	dann	Zygosity
2370	exonic	HNF1B	stopgain	HNF1B:NM_000458:exon7:c.1426C>T;p.Q476X					T	.	.	D		het
	exonic	TSC1	nonsynonymous SNV	TSC1:NM_001162427:exon22:c.2950G>A; p.G984S	Non pathogenic	rs11820374_2		0.0058	T	B	B	D		het
2510	exonic	HNF1B	frameshift deletion	HNF1B:NM_000458:exon2:c.540_544del;p.L180fs										het
	exonic	TSC2	nonsynonymous SNV	TSC2:NM_000548:exon14:c.1387A>G;p.I463V	Probable-non-pathogenic	rs45517171		0.0029	T	P	D	D	0.982	het
2071	exonic	PKHD1	frameshift deletion	PKHD1:NM_138694:exon58:c.9689delA; p.D3230fs	Pathogenic									het
	splicing	PKHD1		PKHD1:NM_138694:exon12:c.778+3A>G										het
526	exonic	PKHD1	frameshift deletion	PKHD1:NM_138694:exon60:c.10036_10045del;p.C3346fs										het
	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon50:c.8012G>C;p.R2671P					D	P	P	N	0.986	het
226	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon32:c.4751G>C;p.S1584T					D	P	P	N	0.996	het

Tabla 34. Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de esclerosis tuberosa diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AAChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_Pred	Polyphen2_HVAR_Pred	MutationTaster_Pred	dann	Zygosity
2195	splicing	TSC2		TSC2:NM_001114382:exon10:c.975+1->T										het
2173	exonic	TSC2	stopgain SNV	TSC2:NM_001077183:exon32:c.C4058G;p.S1353X					D			A		het

Tabla 35. Variantes identificadas en los pacientes para los cuáles no conocíamos la patología de base diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AAChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_Pred	Polyphen2_HVAR_Pred	MutationTaster_Pred	dann	Zygosity
2855	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon36:c.10742delC;p.P3581fs										het
2418	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon23:c.8662C>T;p.R2888C					D	D	P	N		het
2402	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon5:c.1095-2A>G								D		het
2547	exonic	TSC2	nonsynonymous SNV	TSC2:NM_000548:exon18:c.1882C>T;p.R628C	Untested	rs45437797		0.0005	D	D	D	D	0.999	het

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zyg: Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.

El resultado global de toda la cohorte de 81 pacientes, es que tras haberle realizado el panel de 8 genes, se obtuvo un resultado positivo en 39 de ellos (48%). Además, de los 39 casos con resultado positivo, 29 eran portadores de variantes en genes asociados a ADPKD (variantes identificadas en los genes *PKD1* y *PKD2*), 6 portadores de variantes en genes asociados a ARPKD y 4 de variantes en genes asociados a TSC (figura 33).

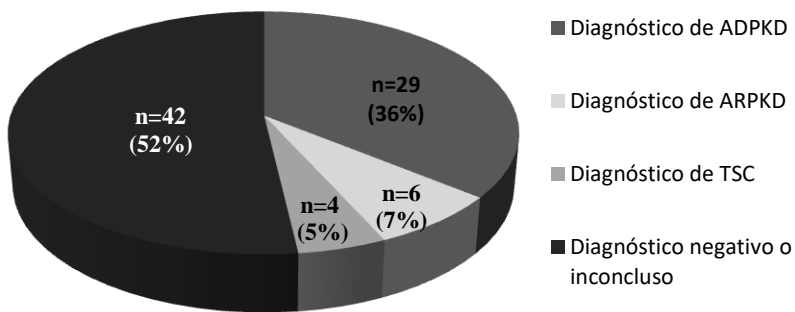


Figura 33. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 8 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología.

Aquellos pacientes en los que no se obtuvo un diagnóstico genético positivo se analizaron genéticamente mediante el test de amplicones para la región replicada del gen *PKD1*, ya que es posible que el panel de 8 genes no haya cubierto bien dicha región. Se le ha realizado el test a 25 de los 29 pacientes negativos que presentaban sospecha clínica de PKD y a los 6 pacientes para los que tampoco identificamos la mutación mediante el panel de 8 genes y desconocemos cual es la patología de base. De esta forma, identificamos la variante que cumple criterios de patogenicidad y que probablemente justifica

el fenotipo asociado a la enfermedad en 7 casos de los que presentaban sospecha clínica de PKD y en 1 caso de los negativos para 8 genes y para los cuáles el diagnóstico clínico era desconocido.

En base a estos resultados, ya no serían 42 pacientes los que no tienen diagnóstico clínico positivo, sino que ahora tenemos identificada la variante patogénica en el gen *PKD1* en 8 pacientes más, por tanto, cambian los porcentajes de diagnóstico de la figura anterior siendo, 34 pacientes (42%) los que tienen un diagnóstico genético negativo o inconcluso, 37 diagnóstico genético de ADPKD (45.7%), 6 pacientes diagnóstico genético de ARPKD (7.3%) y 4 pacientes esclerosis tuberosa (5%) (Figura 34). En la tabla 36 se muestran los 8 pacientes con las variantes identificadas mediante la estrategia de amplicones para la región replicada del gen *PKD1*.

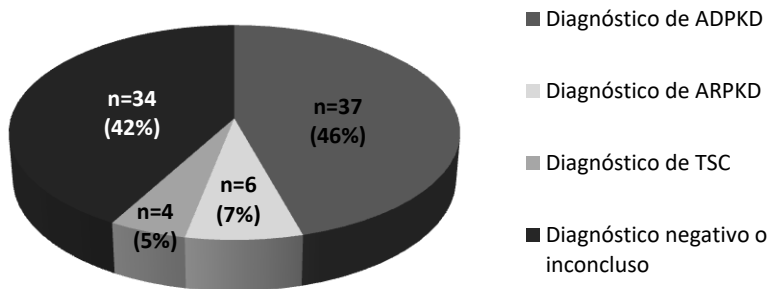


Figura 34. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 8 genes y el test de amplicones para la región replicada del gen *PKD1* en aquellos pacientes que fueron negativos para el panel de 8 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología.

Tabla 36. Variantes identificadas en los pacientes negativos para el panel de 8 genes, los cuáles se diagnosticaron mediante amplicones para la región replicada de *PKD1*.

Patient	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zygosity
2021	exonic	PKD1	stopgain	PKD1:NM_000296:exon22:c.8137G>T;p.G2713X					D			A	0.973	het
2178	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon17:c.7153T>C;p.S2385P					D	D	D	D		het
2256	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon15:c.3745delG;p.D1249fs										het
2360	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon11:c.2187_2209del;p.C729fs										het
	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon20:c.7835C>T;p.S2612L		rs200646755		0.0001	D	D	D	D	0.999	het
82	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon1:c.165_171del;p.G55fs										het
151	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon11:c.2298_2308del;p.A766fs				0						het
1956	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon18:c.7307G>T;p.G2436V					D	D	D	D	0.998	het
2925	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon46:c.12451A>G;p.K4151E				0	D	D	D	D	0.997	het

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zig: Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.

B) Diagnóstico de una cohorte de pacientes con sospecha clínica de PKD y solicitud de diagnóstico mediante el panel para enfermedad quística común de 11 genes:

Mediante el panel de enfermedad quística común de 11 genes, se analizó a una cohorte de 25 pacientes remitidos al laboratorio con la solicitud correspondiente para la realización de dicha prueba genética. No conocemos la patología de base de la cuál sospecha el clínico para el 76% de los casos (n=19). Sabemos que 2 pacientes (8%) presentan sospecha clínica de PKD, 3 (12%) de ARPKD y 1 (4%) de ADMCKD.

Una vez terminado el estudio genético, se pudo concluir que de los 2 pacientes con sospecha de PKD, en 1 de ellos (50%) se identificó una variante que cumple criterios de patogenicidad en el gen *PKD1* que podía justificar el fenotipo asociado a la enfermedad (ID: 3499). El otro paciente (50%) resultó negativo para la prueba.

En los pacientes con sospecha clínica conocida de ARPKD, sólo en uno de ellos (33.3%) se identificaron dos variantes en el gen *PKHD1*, que podrían justificar el fenotipo (ID: 3252), mientras que en los otros dos casos (66.7%) sólo se identificó una variante en el gen, clasificándose el caso como inconcluso (ID: 3139 y 3539).

Para el paciente con sospecha clínica de ADMCKD (100%) identificamos una variante que cumple criterios de patogenicidad en el gen *UMOD* asociado a Enfermedad Quística Medular tipo 2 (ID: 3324).

De los 19 pacientes restantes para los cuales no disponemos de información acerca de la patología de base, el diagnóstico genético resultó positivo en 13 de los casos (68.4%). En concreto 7 pacientes eran portadores de variantes que cumplen criterios de patogenicidad en el gen *PKD1*, (ID: 2772, 2793, 3095, 3100, 3123, 3401 y 3455), 3 pacientes portadores de variantes patogénicas en el gen *PKD2*, (ID: 3154, 3355 y 1947),

1 portador de variante en el gen *GANAB* (ID: 2994), 1 individuo portador de una variante probablemente asociada a enfermedad en el gen *UMOD* (ID: 3091) y un caso de interacción génicas entre los genes *UMOD* y *PRKCSH* (ID:3402). Por tanto, tras estos resultados se concluye que de la cohorte de 25 pacientes, se obtuvo un diagnóstico genético positivo en 16 pacientes (64%). De estos 16, 12 fueron diagnosticados genéticamente como casos de ADPKD (48%), 3 casos de ADMCKD (12%) y 1 caso de ARPKD (4%) (figura 35). En la tabla 37 se muestran las variantes génicas identificadas en los pacientes con diagnóstico genético positivo y también se indican las variantes identificadas en el gen *PKHD1* para los dos pacientes clasificados con diagnóstico genético inconcluso.

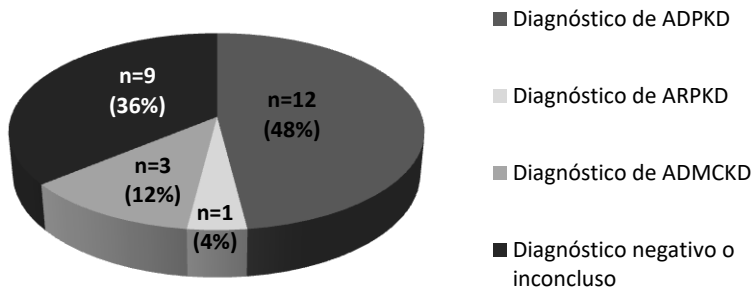


Figura 35. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 11 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología.

Los 9 pacientes con diagnóstico genético negativo para el panel de 11 genes los analizamos mediante la estrategia de amplicones para la región replicada del gen *PKDI*, pero el resultado fue igualmente negativo, no identificándose ninguna otra variante génica que cumpliese criterios de patogenicidad y que pudiese justificar el fenotipo asociado a la enfermedad.

Tabla 37. Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de enfermedad quística común de 11 genes.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AAChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zigosity
3499	exonic	PKD1	stopgain	PKD1.NM_000296:exon38:c.11075C>A;p.S3692X	Pathogenic			0				A	0.981	het
3252	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1.NM_170724:exon39:c.6446G>C;p.R2149T				0	T	D	P	D	0.981	het
	splicing	PKHD1		PKHD1.NM_138694:exon2:UTR5				0					0.435	het
3139	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1.NM_138694:exon37:c.6116T>C;p.L2039P		rs777228780		0.000008964	D	D	D	D	0.999	het
3539	exonic	PKHD1	stopgain	PKHD1.NM_138694:exon34:c.5485C>T;p.Q1829X	Likely pathogenic	rs774759689						A	0.968	het
3324	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD.NM_001008389:exon3:c.194A>G;p.D65G				0	D	D	D	D	0.997	het
2772	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1.NM_000296:exon15:c.3739A>G;p.M1247V				0	D	P	P	D	0.993	het
2923	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1.NM_000296:exon46:c.12464A>G;p.E4155G				0	D	D	D	D	0.998	het
3095	exonic	PKD1	stopgain	PKD1.NM_000296:exon17:c.7126C>T;p.Q2376X				0				A	0.996	het
3100	exonic	PKD1	stopgain	PKD1.NM_000296:exon23:c.8251C>T;p.Q2751X				0				A	0.987	het
3123	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1.NM_000296:exon18:c.7400C>G;p.P2467R				0	T	D	D	D	0.998	het
3401	exonic	PKD1	stopgain	PKD1.NM_000296:exon20:c.7816C>T;p.Q2606X				0				A	0.997	het
3455	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1.NM_000296:exon19:c.7546C>T;p.R2516C	Likely pathogenic	rs797044902	rs797044902	0	D	D	D	D	0.999	het
3154	splicing	PKD2		PKD2.NM_000297:exon1:c.595+1G>C				0				D	0.993	het
3355	exonic	PKD2	nonsynonymous SNV	PKD2.NM_000297:exon5:c.1242G>T;p.W414C	Uncertain significance			0	D	D	D	D	0.993	het
1947	exonic	PKD2	nonsynonymous SNV	PKD2.NM_000297:exon5:c.1301A>G;p.N434S				0	D	D	D	D	0.999	het
2994	exonic	GANAB	nonsynonymous SNV	GANAB.NM_001329222:exon14:c.1346C>A;p.P449Q				0	D	D	D	D	0.994	het
3091	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD.NM_001008389:exon3:c.202G>C;p.E68Q				0	D	D	D	D	0.998	het
3402	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD.NM_001278614:exon8:c.1463T>C;p.M488T				0	T	B	B	N	0.777	het
	exonic	PRKCSH	nonsynonymous SNV	PRKCSH.NM_001289104:exon6:c.416G>A;p.R139H	Conflicting interpretations of pathogenicity	rs139991238		0.0074		D	D	D	0.999	het

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.

C) Diagnóstico de una cohorte de pacientes con sospecha clínica de PKD y solicitud de diagnóstico mediante el panel para enfermedad quística común, rara y ultrarara de 72 genes:

Mediante el panel de enfermedad quística común, rara y ultrarara se estudió genéticamente a una cohorte de 33 pacientes enviados al laboratorio para diagnóstico genético mediante el panel de 72 genes. Solamente sabemos que 9 de los 33 (27.3%) presentaban sospecha clínica de PKD y 1 de los 33 (3%) sospecha de ADMCKD. De los restantes pacientes no disponemos de información acerca de la patología de base.

La prueba genética permitió confirmar que 4 de los 9 pacientes (44.5%) eran casos de ADPKD, ya que en ellos se identificaron variantes en los genes *PKD1* y *PKD2*, ambos asociados a ADPKD-I y ADPKD-II respectivamente. En 2 pacientes (22.2%) se identificaron variantes que cumplen criterios de patogenicidad en el gen *UMOD* y en otro paciente (11.1%) (ID: 2422) se identifica una interacción génica entre los genes *UMOD* y *PKHD1*. Por último, en otros 2 pacientes (22.2%) el resultado fue negativo para los genes analizados.

El diagnóstico genético también confirmó la sospecha clínica del paciente con ADMCKD (ID: 2562), ya que se identificó una variante que cumple criterios de patogenicidad en el gen *UMOD* asociado a enfermedad quística medular tipo 2, interaccionando, además, genéticamente con una variante identificada en el gen *PKHD1*.

Para los 23 pacientes restantes para los que no disponemos de información clínica, el estudio genético concluyó que 2 de 23 (8.7%) eran casos de ADPKD (ID: 3128 y 2104), 1 de 23 (4.3%) caso de ARPKD (ID: 2179), 1 paciente (4.3%) (ID: 2049) diagnosticado de síndrome de Meckel, ya que se identificó una variante en homocigosis en el gen *B9D1*, 2 pacientes (8.7%) diagnosticados de ADMCKD (ID: 2433 y 846) y otros 2 (8.7%) (ID: 2395 y 2841) con síndrome de Bardet-Biedl. En concreto,

en estos dos últimos casos se identificaron variantes probablemente patogénicas en homocigosis en los genes *BBS1* y *BBS12*, respectivamente.

El diagnóstico genético resultó negativo para 8 de los pacientes (34.8%) e inconcluso para los 9 pacientes restantes (39.1%) ya que simplemente se identificó una variante en heterocigosis en genes que tienen un modo de herencia recesivo. En la tabla 38 se indican todas las variantes identificadas en los pacientes con un diagnóstico genético positivo. No se citan los pacientes en los que no se identificó ninguna variante y tampoco se describen las variantes identificadas en los pacientes con diagnóstico genético inconcluso.

En resumen, de los 33 pacientes sometidos a diagnóstico genético mediante el panel de 72 genes se pudo diagnosticar a 16 pacientes (48.5%), siendo inconclusos el 27.3% (9 de 33) y negativos el 24.3% restante (8 de 33) (figura 36).

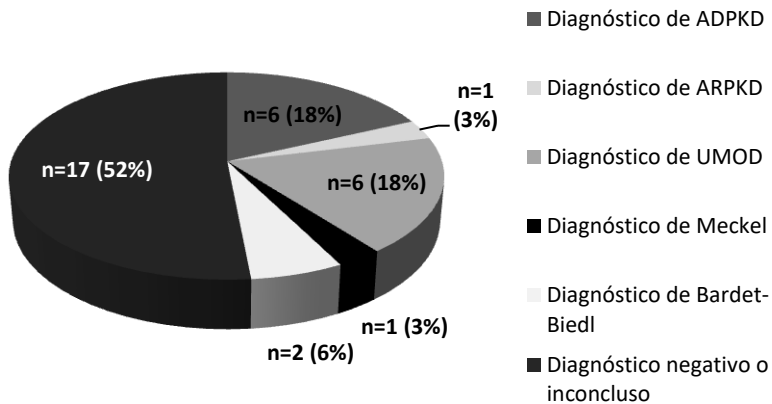


Figura 36. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística de 72 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología.

Tabla 38. Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de enfermedad quística común, rara y ultrarara de 72 genes.

Patient	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AAChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zygotity
1943	exonic	PKD1	stopgain	PKD1:NM_000296:exon46:c.C12709T:p.Q4237X					T	.	.	D		het
283	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon13:c.G2509T:p.E837X					T	.	.	A		het
2194	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C								D		het
2303	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon6:c.1390C>T:p.R464X	Pathogenic	rs121918042			T			A		het
2304	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon4:c.947A>C:p.Q316P					T	D	P	N		het
2429	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon3:c.665G>C:p.R222P					D	D	D	N	0.996	het
2422	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon3:c.665G>C:p.R222P					D	D	D	N	0.996	het
	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon52:c.8282A>T:p.D2761V					D	P	P	D	0.983	het
2562	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon3:c.764G>A:p.C255Y	Pathogenic	rs121917771	rs121917771		D	D	D	D	0.997	het
	exonic	PKHD1	frameshift deletion	PKHD1:NM_170724:exon5:c.383delC:p.T128fs										het
3128	exonic	PKD1	frameshift insertion	PKD1:NM_000296:exon15:c.6483dupG:p.R2162fs				0						het
2104	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C								D		het
2179	exonic	PKHD1	frameshift deletion	PKHD1:NM_138694:exon58:c.9689delA:p.D3230fs	Pathogenic									het
	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon32:c.C4165A:p.P1389T					D	D	D	D		het
2049	exonic	B9D1	frameshift insertion	B9D1:NM_001243473:exon6:c.559_560insT:p.H187fs										hom
2433	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon3:c.202G>C:p.E68Q					D	D	D	D	0.998	het
846	exonic	UMOD	nonsynonymous SNV	UMOD:NM_001008389:exon4:c.947A>C:p.Q316P					T	D	P	N	0.988	het
2395	exonic	BBS1	nonsynonymous SNV	BBS1:NM_024649:exon12:c.1169T>G:p.M390R	Pathogenic	rs113624356		0.0043	D	D	P	A	0.99	hom
2841	exonic	BBS12	stopgain	BBS12:NM_152618:exon2:c.1063C>T:p.R355X	Pathogenic	rs121918327	rs121918327	0.0001				A	1	hom

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.

A los 8 pacientes con diagnóstico genético negativo para el panel de 72 genes se les realizó el test de amplicones para la región replicada del gen *PKD1* y a uno de ellos se le identificó una variante no truncante que cumple criterios de patogenicidad en el gen *PKD1* (ID: 1956; PKD1: NM_001009944: exon18: c.7307G>T:p.G2436V). Por tanto, ahora el número de individuos negativos o inconclusos sería 16 y 7 serían pacientes ADPKD. Los porcentajes quedarían repartidos como se observa en la figura 37.

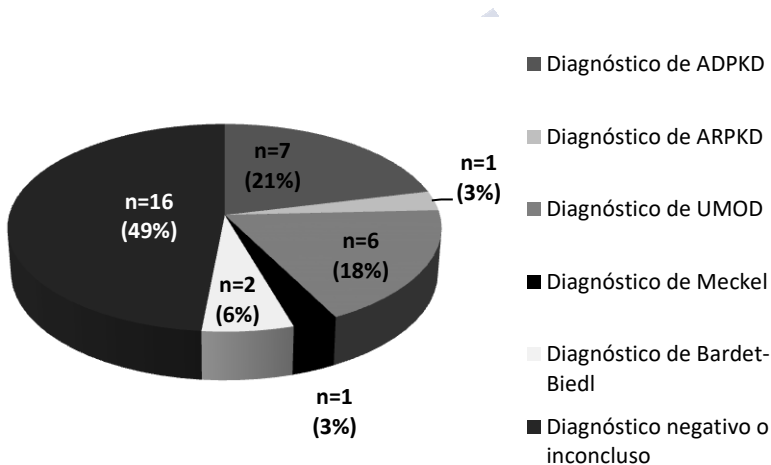


Figura 37. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común, rara y ultra de 72 genes junto con la región replicada del gen *PKD1* mediante la estrategia de amplicones.

3.2. Análisis de variantes mediante la estrategia de diagnóstico 2 (amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* + paneles haloplex en caso negativo)

Dado que la enfermedad quística más común es la poliquistosis renal autosómica dominante y que la mayoría de los pacientes que recibimos para diagnóstico presentan mutación en alguno de los genes asociados a ADPKD, se propone plantear otra estrategia que consiste en utilizar el test de amplicones como primera forma de diagnóstico. Sabiendo que un 85% de los pacientes con ADPKD portan mutación en el gen *PKD1*, lo más probable es que si utilizamos una tecnología que cubre bien dicho gen, identifiquemos la mutación, y al mismo tiempo también se le están analizando los genes *PKD2* y *GANAB*. En el caso de que no se le identifique la mutación se le realiza el panel de HaloPlex para enfermedad quística común o para enfermedad quística común, rara y ultra-rara, dependiendo de cual se la solicitud de diagnóstico.

A) Diagnóstico de una cohorte de pacientes con sospecha clínica de PKD mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*:

Partimos de una cohorte de 36 individuos de los cuales conocemos que 12 (33.3%) tienen sospecha clínica de PKD y de los 24 restantes no disponemos de información. Todos llegaron al laboratorio con solicitud de diagnóstico de enfermedad renal quística. En concreto, a 6 de los 24 pacientes le solicitaban diagnóstico mediante el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes (ID: 2570, 2445, 2545, 2564, 2491, 3400).

Tras el estudio genético le identificamos la mutación probablemente patogénica y asociada a ADPKD en 24 pacientes de los 36 (67%) (Figura 38). En concreto se identificó en 9 de

los 12 pacientes (75%) de los que conocíamos que presentaban sospecha clínica de PKD y en 15 de los 24 (62.5%) pacientes de los que no disponemos de información clínica (tabla 39).

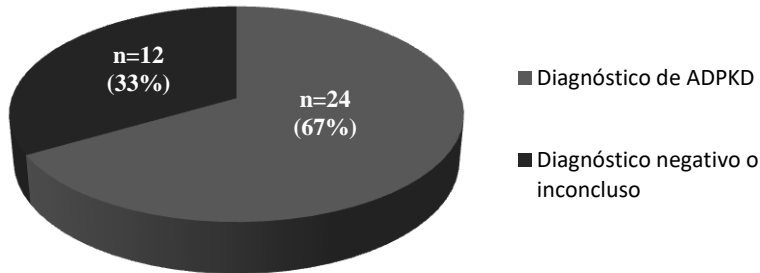


Figura 38. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAβ*.

B) Diagnóstico mediante el panel de HaloPlex de 8 genes para los pacientes negativos para el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAβ*:

Los pacientes negativos se sometieron a análisis genético mediante el panel de 8 genes (a excepción de los pacientes a los que les solicitaban 72 genes). En concreto se incluyeron 7 pacientes, para los cuales se identificó la mutación en 2 (28.6%). Uno de los dos pacientes (ID: 2572) era portador de dos variantes en heterocigosis en el gen *PKHD1* que pueden justificar un fenotipo asociado a ARPKD y en el otro caso (ID: 2664) se identifica una variante truncante en el gen *HNF1B*

(tabla 40). Por tanto, tras la aplicación del panel de 8 genes, de la cohorte total de 36 individuos ahora se ha diagnosticado a 28 pacientes. Como era de esperar estos dos pacientes no son casos de ADPKD, de ahí que no se hayan diagnosticado mediante el test de amplicones (figura 39).

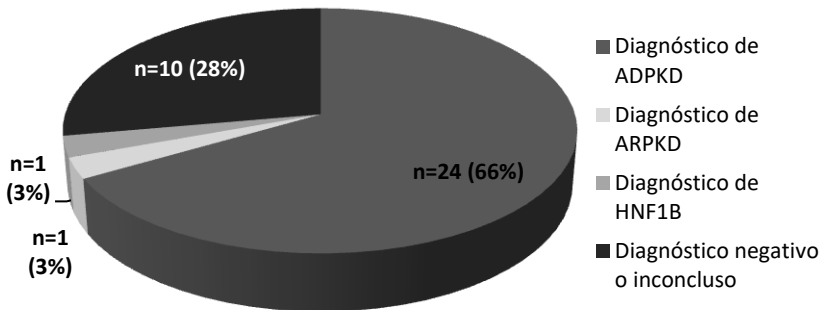


Figura 39. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAβ* y el panel de 8 genes para aquellos pacientes negativos para la primera prueba.

C) Diagnóstico mediante el panel de HaloPlex de 72 genes para los pacientes negativos para el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAβ*:

Por último, 5 de las 6 muestras a las que le solicitaban diagnóstico genético mediante el panel de 72 genes (la que falta hasta las 6 ya se diagnosticó mediante el test de amplicones) se sometieron a dicho panel. Tras el análisis se obtuvo un diagnóstico genético positivo en 3 de los 5 pacientes. En concreto en uno (ID: 2545) se encontró una variante probablemente patogénica en el gen *RPI* asociado a retinitis

pigmentosa tipo 1; en otro paciente (ID: 2491) se identificaron dos variantes que cumplen criterios de patogenicidad en el gen *PKHD1*, y en el otro paciente (ID: 2564) se produjo una interacción génica entre los genes *UMOD* y *PKHD1*.

Por tanto, se ha conseguido diagnosticar a 3 pacientes más, siendo el porcentaje de pacientes inconclusos o no diagnosticados el 19.4% (n=7) (figura 40).

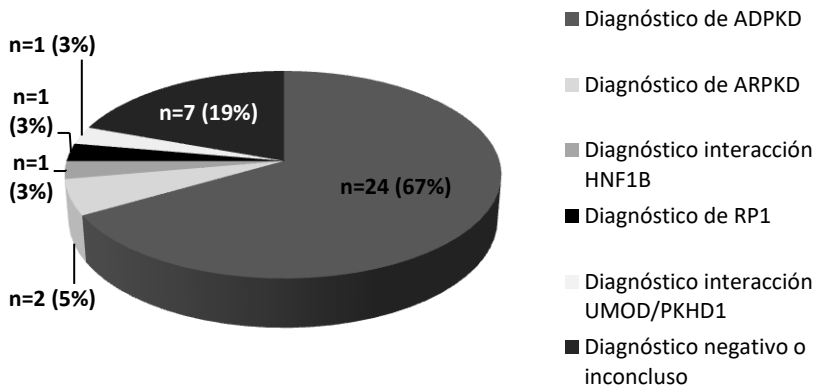


Figura 40. Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* y el panel de 72 genes para aquellos pacientes negativos para la primera prueba.

RESULTADOS. PARTE 1

Tabla 39. Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANA8*.

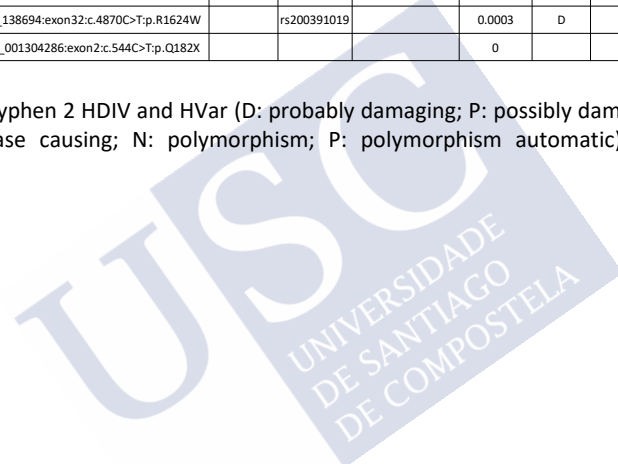
Patient	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AACChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zygoty
2505	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon11:c.2155C>T;p.H719Y					T	D	D	D	0.997	het
2513	exonic	PKD1	frameshift insertion	PKD1:NM_000296:exon24:c.8925dupC;p.Y2976fs										
2494	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon11:c.2155C>T;p.H719Y					T	D	D	D	0.997	het
2537	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon15:c.3745delG;p.D1249fs										het
2568	exonic	PKD1	frameshift deletion	PKD1:NM_000296:exon5:c.578delC;p.A193fs										het
2508	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon27:c.9409C>T;p.H3137Y					D	D	D	D	0.996	het
2445	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon16:c.7036G>A;p.G2346S		rs74580385 2		0.0000065	D	D	D	D	0.998	het
2526	exonic	PKD1	frameshift insertion	PKD1:NM_000296:exon1:c.108dupC;p.C37fs										het
797	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon4:c.1094+2T>G										het
	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon25:c.9034A>G;p.T3012A				0	T	P	P	D	0.994	het
359	exonic	PKD2	nonsynonymous SNV	PKD2:NM_000297:exon6:c.1532A>T;p.D511V										het
	exonic	PKD1	stopgain	PKD1:NM_000296:exon8:c.1660C>T;p.Q554X					T			A	0.996	het
2571	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon23:c.8497C>T;p.P2833S					T	D	D	D	0.999	het
2815	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_001009944:exon42:c.11545G>C;p.A3849P				0	D	D	D	D	0.989	het
2757	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C									0.993	het
2425	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon6:c.1211C>G;p.P404R		rs76757907 3		0.0003	D	D	D	D	0.998	het
2607	exonic	PKD1	stopgain	PKD1:NM_000296:exon14:c.3213C>G;p.Y1071X					T			A	0.994	het
1872	splicing	PKD2		PKD2:NM_000297:exon1:c.595+1G>C									0.993	het
50	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon9:c.1960C>T;p.R654X				0				A	0.998	het
390	exonic	PKD2	stopgain	PKD2:NM_000297:exon4:c.916C>T;p.R306X		rs20000106 8		8.97E-06				A	0.998	het
81	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_001009944:exon26:c.9395C>T;p.S3132L				0	0	D	D	D	0.999	het
3462	exonic	PKD2	nonframeshift deletion	PKD2:NM_000297:exon9:c.1996_2007del;p.666_669del				0						het
3456	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_000296:exon26:c.9241T>C;p.C3081R				0	D	D	D	D	0.967	het
3464	exonic	PKD1	frameshift insertion	PKD1:NM_000296:exon18:c.7287_7288insAGACCACCATCCACGGGCGAGTCAGGCATG;p.R2430fs				0						het
372	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_001009944:exon9:c.1781T>C;p.F594S					D	D	D	D	0.997	het
79	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_001009944:exon26:c.9202G>C;p.E3068Q					T	D	P	D	0.993	het
	exonic	PKD1	nonsynonymous SNV	PKD1:NM_001009944:exon15:c.4103C>T;p.A1368V		rs56218475 4		0.0002	T	D	D	D	0.999	het

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.

Tabla 40. Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*.

ID	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene	AChange.refGene	Clinvar	snp138	snp138NonFlagged	PopFreqMax	SIFT_pred	Polyphen2_HDIV_pred	Polyphen2_HVAR_pred	MutationTaster_pred	dann	Zigosity
2572	exonic	PKHD1	frameshift deletion	PKHD1:NM_138694:exon58:c.9689delA:p.D3230fs	Pathogenic	rs398124502	rs398124502	0.0005						het
	exonic	PKHD1	nonsynonymous SNV	PKHD1:NM_138694:exon32:c.4870C>T:p.R1624W		rs200391019		0.0003	D	D	P	N	0.999	het
2664	exonic	HNF1B	stopgain	HNF1B:NM_001304286:exon2:c.544C>T:p.Q182X				0					0.998	het

SIFT (D: deleterious; T: tolerated). Polyphen 2 HDIV and HVar (D: probably damaging; P: possibly damaging; B: benign). Mutation Taster (A: disease causing automatic; D: disease causing; N: polymorphism; P: polymorphism automatic). Zigosity; het: heterozygous; hom: homozygous.



4. Comparativa de los resultados de cobertura obtenidos mediante los paneles de genes, la estrategia de amplicones y exomas.

Se realizó una comparativa de las coberturas medias de los genes obtenidas mediante distintas tecnologías. En el anexo 3 se muestra la comparación entre los paneles HaloPlex, paneles de amplicones, paneles SureSelect y tres tipos de exomas: *AmpliSeq Exome*, *Clinical Exome* y *Focused Exome*. Se observa que mediante exoma se consigue una cobertura similar a la que ofrecen los paneles de genes, ya que la disminución en el coste de secuenciación permite secuenciar a mayor profundidad de lectura. Sin embargo ninguna de las tecnologías que se muestran, a excepción de la estrategia de amplicones, aportan una cobertura del gen *PKDI* al 100%.



RESULTADOS. PARTE 2

Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal: Establecimiento de un registro gallego y diagnóstico genético como una medida de prevención coste eficiente

1. Establecimiento del Registro Gallego de Enfermedad Poliquística (ReGEP)

Desde Enero del año 2016 hasta Septiembre del año 2018 se recibieron muestras de pacientes con sospecha de enfermedad poliquística renal autosómica dominante y se recogieron los datos clínicos de los mismos con el objetivo de establecer una seroteca y una base de datos de árboles genealógicos que sirva como germen estratégico para la inclusión y asociación familiar de nuevos pacientes.

Durante todo el proyecto se recibieron un total de 573 pacientes (207 pacientes en el año 2016, 199 pacientes en el año 2017 y 167 en el año 2018, ver figura 41). En la figura se representa, además, el número de muestras enviadas por cada hospital de referencia. Se observa que el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) fue el que más muestras remitió al laboratorio, seguido por el Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUOU), le sigue el Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHOP) y el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) como los 4 hospitales de referencia de Galicia con mayor número de envíos.

Las 573 muestras enviadas pertenecen a un total de 396 familias, enviadas por los distintos hospitales. En la figura 42 se observa la distribución del número de familias enviadas por cada centro. Como cabe esperar, el CHUAC, CHUS, CHOP y CHUOU son los 4 hospitales con mayor número de familias. El CHUAC ocupa la primera posición, lo que significa que en vez que enviar a varios pacientes pertenecientes a la misma familia, a enviado pacientes de muchas familias distintas.

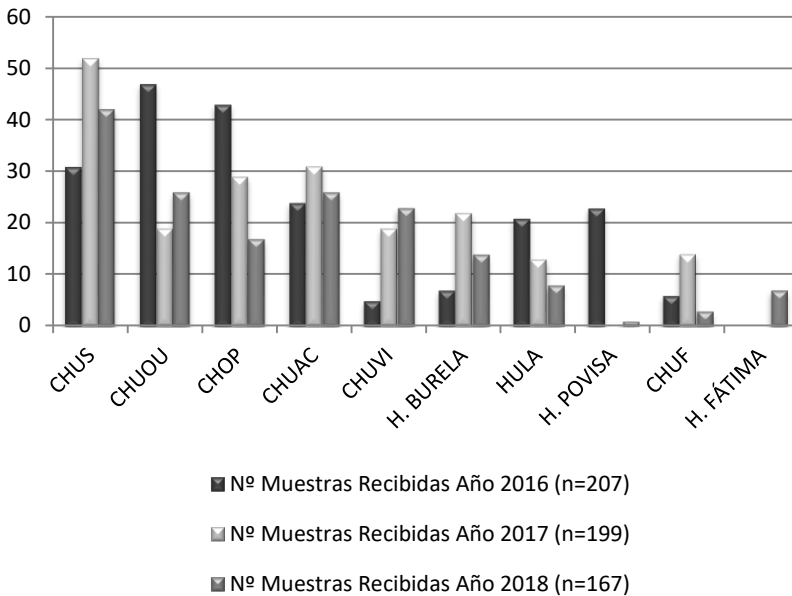


Figura 41. Representación del número de pacientes recibidos por hospital y año a partir de Enero del 2016 y hasta Septiembre del 2018.

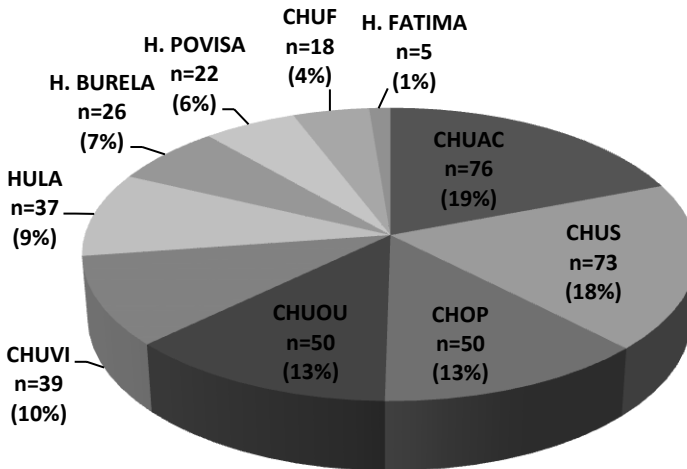


Figura 42. Representación de la distribución por cada hospital del número de familias al que pertenecen los pacientes enviados dentro del proyecto.

Sin embargo, el Proyecto no empezó de cero, sino que en el laboratorio de Nefrología (NefroCHUS) existía un registro histórico de familias poliquísticas, por tanto es necesario saber si los pacientes y las familias que se recibieron eran ya conocidas o no. Se pueden dar varias situaciones:

- Que se recibiese un paciente nuevo (no incluido en el registro histórico), de una familia nueva (no incluida en el registro histórico).
- Que se recibiese un paciente nuevo pero perteneciente a una familia conocida.
- Que se recibiese un paciente conocido perteneciente a una familia ya conocida.

Tras realizar el análisis se observa que el 78% de las familias recibidas no estaban identificadas previamente. Además, y como cabe esperar, el 52% de las familias previamente conocidas son las que proceden del CHUS (figura 43).

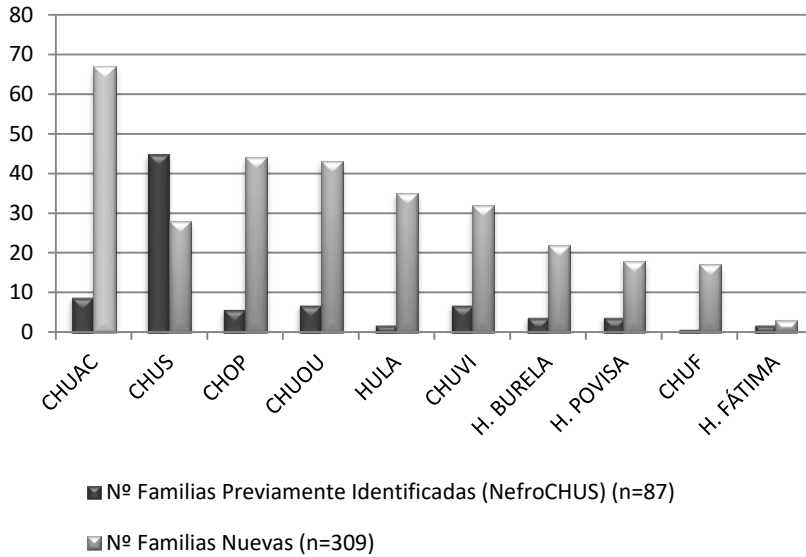


Figura 43. Comparativa entre el número de familias previamente identificadas (NefroCHUS) y el número de familias nuevas recibidas por cada hospital.

En cuanto al número de pacientes, tras realizar el análisis se observa que el 87.5% de los pacientes recibidos no estaban identificados previamente y sólo el 12.5% restante eran conocidos. De igual modo que sucede con el número de

En cuanto al número de pacientes, tras realizar el análisis se observa que el 87.5% de los pacientes recibidos no estaban identificados previamente y sólo el 12.5% restante eran conocidos. De igual modo que sucede con el número de familias, el 73.6% de los pacientes previamente conocidos son los que proceden del CHUS (figura 44).

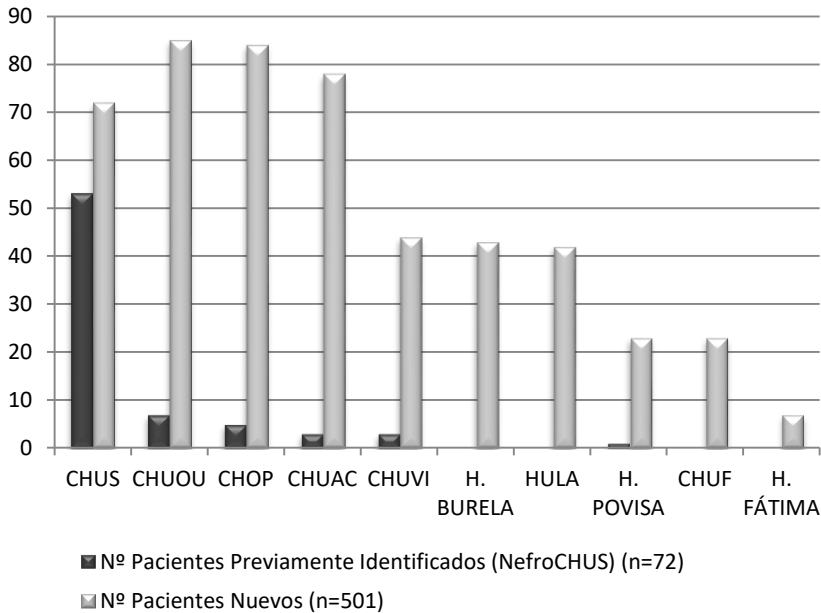


Figura 44. Comparativa entre el número de pacientes previamente identificados (NefroCHUS) y el número de pacientes nuevos recibidos por cada hospital.

2. Criterios de inclusión de los pacientes dentro del Proyecto

Se establecen cuatro únicos criterios a cumplir para poder incluir muestras para diagnóstico genético a través del proyecto:

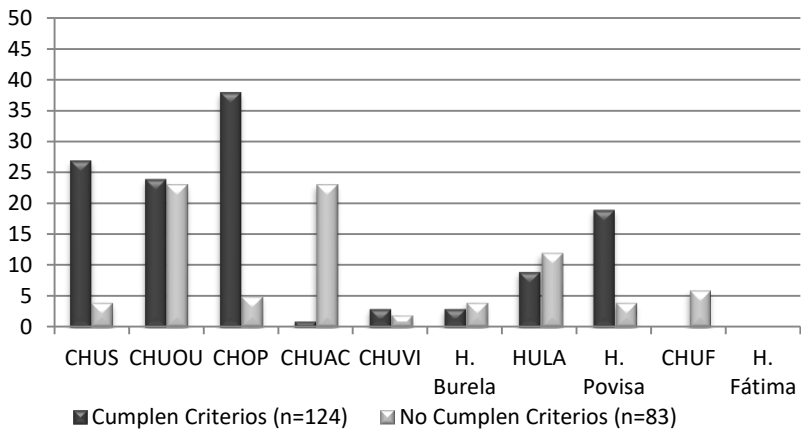
- El paciente probando debe tener antecedentes familiares de la enfermedad de uno o más afectos en la familia.
- Es necesario que se envíe la solicitud de diagnóstico debidamente cumplimentada junto con dos tubos malva de sangre con EDTA del paciente a estudio.
- Envío de árboles genealógicos completos con las máximas generaciones posibles que contenga los

nombres y apellidos de los miembros de la familia afectos y no afectos.

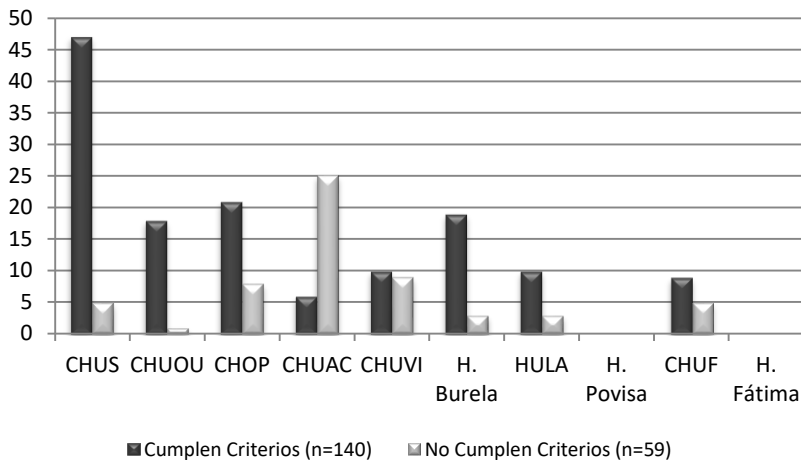
- Consentimiento informado firmado.

En la figura 45 se observa el número de muestras que cumplen los criterios y aquellas que no los cumplen por cada hospital y por cada año.

Año 2016



Año 2017



Año 2018

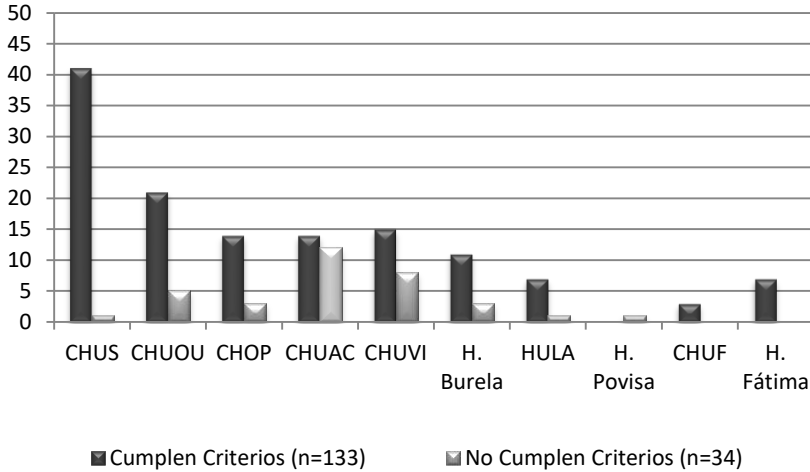


Figura 45. Representación del número de pacientes que cumplen criterios y del número de muestras que no cumplen los criterios por cada hospital y por cada año del proyecto.

Los resultados muestran que en el primer año del proyecto, un 40% de las muestras no cumplían los criterios de inclusión. Sin embargo a medida que avanzaba el proyecto se iban cumpliendo dichos criterios. En el año 2018, un 20% de las muestras son las que quedan pendientes de cumplirlos.

Se contactó con los respectivos facultativos solicitando la información pertinente. A la espera de que envíen dicha información se incorporaron todas las muestras para la realización del estudio genético.

3. Diagnóstico Genético

Se analizaron genéticamente los individuos probando (casos índice) de cada familia mediante el test genético de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*, siempre y cuando no se tuviese previamente diagnosticada a la familia y no se conociese la mutación familiar asociada a la enfermedad. En el caso de que el individuo perteneciese a una familia conocida, con mutación conocida, se realizó estudio de segregación familiar (diagnóstico genético en cascada).

Se muestran los resultados genéticos obtenidos para cada hospital de referencia agrupados por Área Sanitaria.

Área Sanitaria Vigo-Ourense:

Hay 4 hospitales de referencia que conforman el área sanitaria Vigo-Ourense:

Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHOP):

De las 89 muestras enviadas dentro del Proyecto, pertenecientes a 50 familias distintas, sometimos a estudio genético mediante el panel de amplicones a 43 casos índice (individuos probando de cada familia). Los demás eran familiares de los individuos probando enviados para diagnóstico en contexto familiar o eran individuos pertenecientes a familias ya conocidas con la mutación familiar previamente identificada y se diagnosticaron mediante estudio genético en cascada (secuenciación por método sanger de la mutación puntual identificada en la familia).

Tras los estudios genéticos se confirmó que 48 pacientes (27 familias) portaban variantes que cumplen criterios de patogenicidad en el gen *PKD1*, siendo el gen más prevalente,

(31 individuos pertenecientes a 17 familias eran portadores de variantes de tipo truncante y 17 individuos pertenecientes a 10 familias portaban variantes de tipo no truncante) y en 12 pacientes (9 familias) se identificó la variante patogénica en el gen *PKD2*. En 15 casos (pertenecientes a 14 familias) no se identificó ninguna variante que pudiese justificar el fenotipo asociado a la enfermedad (figura 46).

Por tanto, un total de 60 pacientes pertenecientes a 36 familias son casos de ADPKD (mutación identificada en los genes *PKD1* o *PKD2*). En la tabla del anexo 4 se muestran las variantes identificadas en cada familia.

En 14 pacientes (clínicamente no afectados) pertenecientes a familias poliúísticas se realizó estudio genético en cascada y se confirmó que no eran portadores de la mutación familiar y que por tanto no se trata de casos de ADPKD (estos pacientes no se incluyen en la figura, porque clínicamente no eran afectados).

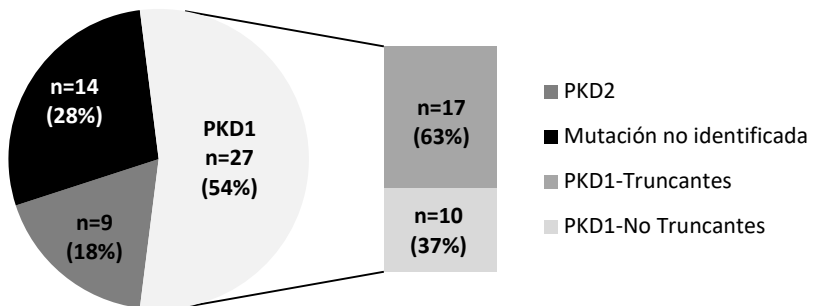


Figura 46. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHOP.

Por tanto, teniendo en cuenta el número de familias con mutación identificada, el 75% de los casos son portadores de mutación en el gen *PKD1* y el 25% restante son portadores de mutación en el gen *PKD2*.

Complejo Hospitalario de Ourense (CHUOU):

De las 92 muestras enviadas desde el CHUOU (pertenecientes a 50 familias) para diagnóstico genético, se les realizó el test a 46 individuos probando (casos índice de cada familia).

Los resultados revelaron que 36 pacientes (pertenecientes a 20 familias) eran portadores de mutación en el gen *PKD1* (29 pacientes pertenecientes a 14 familias portaban mutación de tipo truncante y 7 pacientes pertenecientes a 6 familias portaban variante de tipo no truncante), 13 individuos (pertenecientes a 7 familias) portadores de mutación en el gen *PKD2* y en otros 3 pacientes (2 familias) se identificaron las variantes probablemente asociadas a la enfermedad en otros genes; en 2 pacientes (ID: 2789 y 2790) pertenecientes a la familia PKD_CHUOU313 se identificaron 2 variantes en el gen *PKHD1* que pueden justificar fenotipos asociados a ARPKD y en un paciente (ID: 3101, familia PKD_CHUOU446) se identificó una interacción génica entre los genes *HNF1B* y *TSC2* (figura 47 y tabla de anexo 4).

En 34 pacientes (21 familias) no se identificó mutación en los genes *PKD1*, ni *PKD2* ni *GANAB* (figura 47).

Además, los 6 pacientes restantes, clínicamente no afectos, pertenecientes a familias ADPKD, se estudiaron mediante estudio de segregación familiar y se confirmó que no son portadores de la mutación familiar, y por tanto, no son casos de ADPKD (no se incluyen en la figura, ya que clínicamente ya se sabía que no eran afectos y se confirmó mediante el estudio genético).

En resumen, se confirma que de las 50 familias enviadas, 2 de ellas, las familias PKD_CHUOU313 y PKD_CHUOU446, no son familias ADPKD. Se confirma igualmente que 27 son familias ADPKD y las 21 familias restantes no están resueltas genéticamente, sabiéndose que no son portadoras de mutación en los genes *PKD1*, *PKD2* ni *GANAβ* en base a la tecnología utilizada.

A la vista de los resultados, en el CHUOU la prevalencia de los genes mutados (en porcentaje) se distribuye de la siguiente manera: 69% *PKD1*, 24% *PKD2* y 7% otros genes PKD.

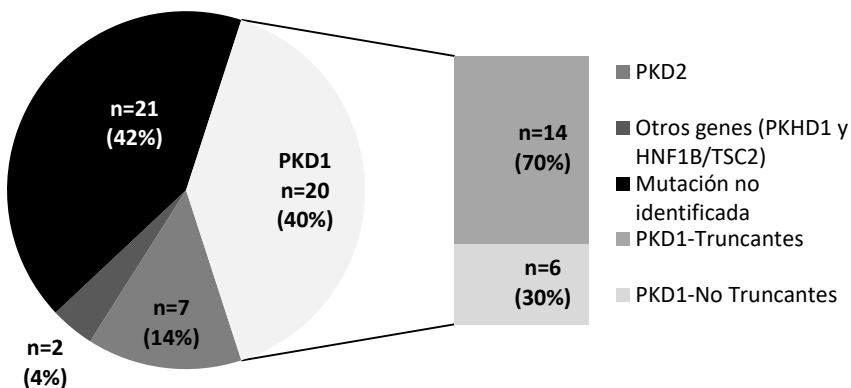


Figura 47. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUOU.

Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI):

Para el total de muestras procedentes del CHUVI (47 muestras pertenecientes a 39 familias) se realizó test genético de amplicones a 32 casos índice. En los demás (n=15), familiares

de los casos índice o pacientes de familias conocidas, se realizó estudio de segregación familiar mediante secuenciación tipo sanger.

Las pruebas genéticas concluyeron que 13 pacientes (pertenecientes a 11 familias) eran portadores de mutación de tipo truncante en el gen *PKD1*, 9 pacientes (correspondientes a 9 familias) de tipo no truncante en el mismo gen y un paciente (1 familia) portador de mutación en el gen *PKD2* (tabla del anexo 4). En 23 individuos (18 familias), mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* no se identificó la mutación responsable de la enfermedad (figura 48). En un individuo, no afecto, mediante la realización del estudio de portadores, se concluyó que no era portador de la mutación familiar y, por tanto, que no era un paciente con ADPKD (no se representa en la figura 48).

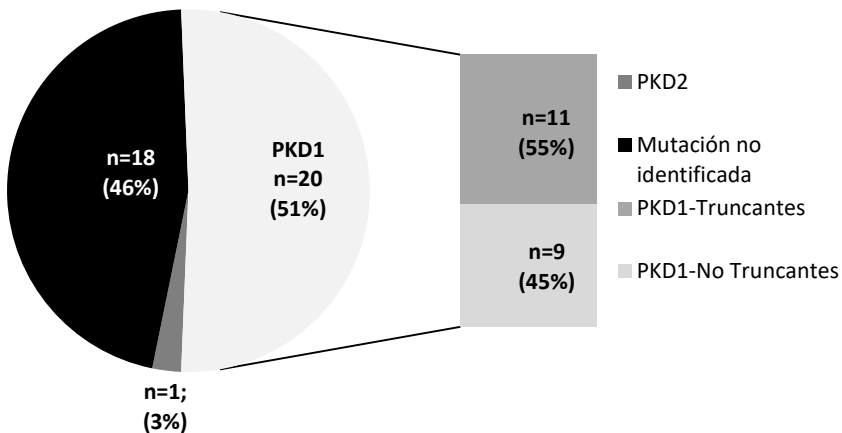


Figura 48. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUVI.

En resumen, 23 pacientes (21 familias) del total de enviados por el CHUVI son casos de ADPKD y 23 individuos (18 familias) no están resueltos genéticamente. A parte, se confirmó que 1 paciente, clínicamente no afecto, no portaba la mutación familiar y no era un caso de ADPKD.

Partiendo de dicha información y en base al porcentaje de familias diagnosticadas y portadoras de mutación en genes asociados a ADPKD, las tasas de mutagenicidad de los genes son: 95% *PKD1* y un 5% *PKD2*.

Hospital de Povisa:

Un total de 24 pacientes (correspondientes a 22 familias) fueron recibidos desde este centro, de los cuales 19 fueron sometidos al panel genético (individuos probando) y los 5 restantes se analizaron mediante estudio de segregación familiar.

A un total de 13 pacientes (12 familias) se le identificaron mutaciones en el gen *PKD1*, en concreto 7 (6 familias) eran portadores de mutaciones de tipo truncante y 6 (6 familias) de tipo no truncante. Únicamente en un paciente (ID: 2785, familia PKD_POV310) se identificó la mutación asociada a la enfermedad en el gen *PKD2*. Además, en otro paciente (ID: 2721, familia PKD_POV428) se identificaron dos variantes que cumplen criterios de patogenicidad en el gen *PKHD1* y en un paciente (ID: 2926, familia PKD_POV275) se identificó una variante en el gen *RPI* asociado a retinitis pigmentosa tipo 1 (figura y tabla del anexo 4). En los 8 pacientes restantes (7 familias) no se identificaron variantes que pudiesen estar asociadas a la enfermedad en los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* (figura 49).

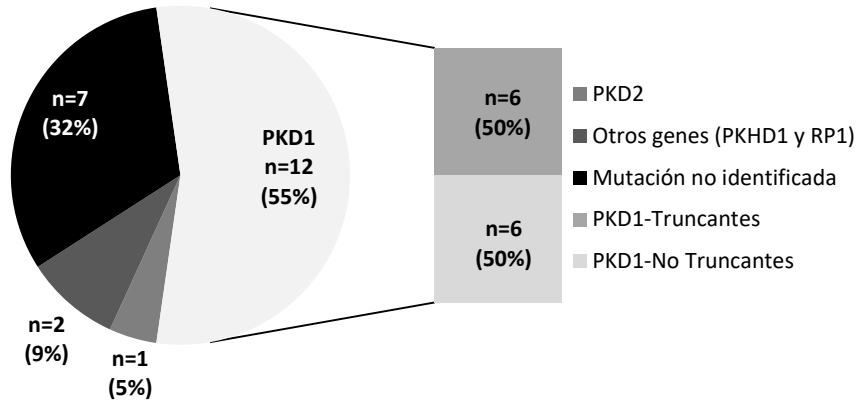


Figura 49. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el Hospital de Povisa.

En resumen, 14 pacientes (13 familias) del total de individuos enviados desde el Hospital de Povisa son casos de ADPKD y 8 individuos (7 familias) no están resueltos genéticamente.

En base al total de familias con diagnóstico genético positivo, el 80% portan la mutación en el gen *PKD1*, el 7% en el gen *PKD2* y el 13% en otros genes (*PKHD1* y *RP1*).

Hospital Vithas Nuestra Señora de Fátima:

Inicialmente, el Hospital de Fátima de Vigo no estaba involucrado en el proyecto. Sin embargo en el año 2018 nos envió 7 muestras pertenecientes a 5 familias para diagnóstico genético. Tras haber sometido a un individuo probando de cada familia al panel de amplicones, no se identificó ninguna variante patogénica que pudiese justificar la enfermedad. Por tanto, los 7 casos resultaron negativos para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*, en base a la tecnología empleada para el diagnóstico (no se muestra figura).

Resultados generales para el Área Sanitaria Vigo-Ourense

De forma global, y tras haber realizado el análisis de forma independiente para cada uno de los hospitales de referencia, los resultados obtenidos en cuanto al diagnóstico genético para los pacientes pertenecientes al Área Sanitaria Vigo-Ourense muestran que:

- Un total de 146 pacientes pertenecientes a 97 familias se confirman como casos de ADPKD.
- Un 78% de las familias diagnosticadas portan mutación en el gen *PKD1*, un 18% en el gen *PKD2* y un 4% en otros genes (*PKHD1*, *RPI*, etc).
- Un total de 80 pacientes (pertenecientes a 60 familias) (sin incluir los procedentes del H. de Fátima) fueron casos no resueltos genéticamente, ya que no se le identificó mutación probablemente causante de la enfermedad en ninguno de los 3 genes estudiados asociados a ADPKD.

Debemos tener en cuenta que, a pesar de que les realizamos el análisis a todos los pacientes recibidos, el 49% de los pacientes no resueltos genéticamente no cumplían criterios de inclusión en

el proyecto. En la figura 50 se desglosan los porcentajes por cada hospital y el motivo por el cual no se cumplían los criterios de inclusión, siendo uno de los motivos principales la falta de antecedentes familiares de enfermedad (requisito indispensable tratándose de una enfermedad hereditaria con un modo de herencia dominante).

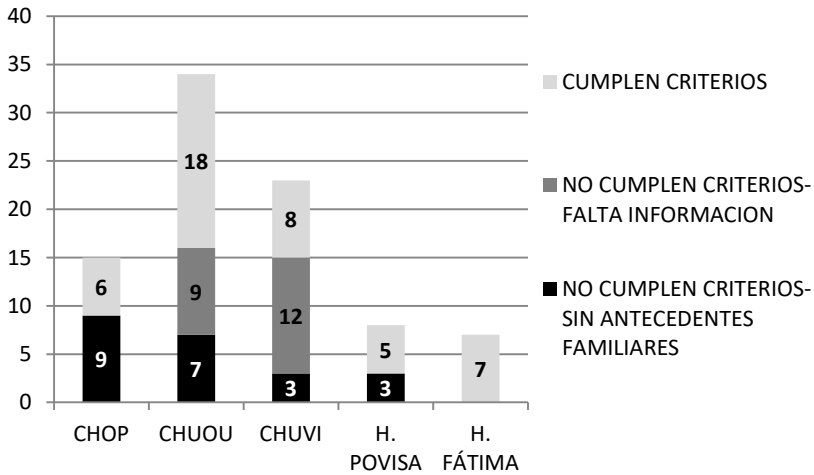


Figura 50. Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria Vigo-Ourense, se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético.

Área Sanitaria A Coruña-Ferrol:

A continuación se muestran los resultados genéticos obtenidos para los dos hospitales de referencia que conforman dicha área sanitaria.

Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF):

Recibimos un total de 23 muestras de pacientes pertenecientes a 18 familias distintas. Se le realizó el test de amplicones para los 3 genes asociados a ADPKD a 16 individuos probando. En los demás casos se hizo estudio de segregación, bien porque se trataba de familiares de los casos índice a los que se les hizo el panel o porque se trataba de individuos que pertenecían a una familia previamente conocida con la mutación causal ya identificada.

El resultado genético mostró que 6 individuos (5 familias) portaban mutación en el gen *PKD1*; 2 pacientes (2 familias) de tipo truncante y 4 paciente (3 familias) de tipo no truncante. Además, otros 3 pacientes pertenecientes a 3 familias distintas eran portadores de mutaciones en el gen *PKD2*, otro paciente de otra familia portaba la mutación en el gen *GANAB*, siendo la primera familia identificada de toda nuestra cohorte de estudio con mutación en dicho gen.

En total, 10 pacientes pertenecientes a 9 familias procedentes del CHUF eran casos de ADPKD (figura 51 y tabla del anexo 4). De los 13 individuos restantes, 9 de ellos (9 familias) resultaron negativos para el test genético (mutación no identificada) (figura 51), y los 4 restantes eran familiares no afectados clínicamente que tras el estudio de segregación familiar resultaron negativos para la mutación familiar (no incluidos en la figura 51).

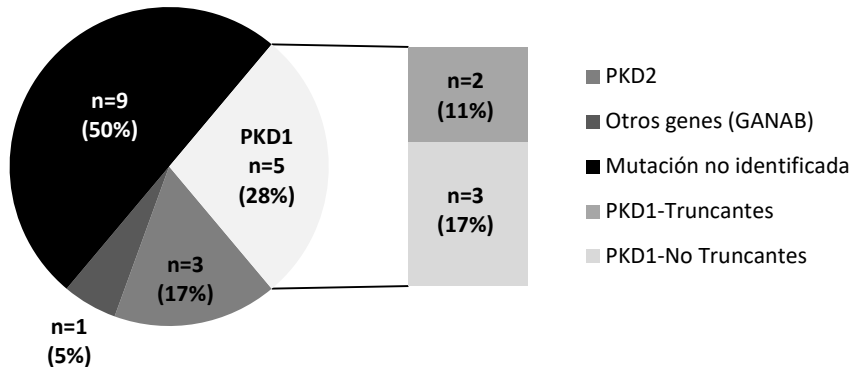


Figura 51. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUF.

Por tanto, en base a las familias recibidas desde el CHUF con diagnóstico genético, el 56% portan mutación en el gen *PKD1*, el 32% en el gen *PKD2* y el 11% en otros genes (*GANAB*).

Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC):

De las 81 muestras (76 familias) procedentes del CHUAC se ha realizado el estudio de amplicones para los 3 genes asociados a ADPKD a 70 casos índice. A los demás se les hizo estudio de segregación familiar ya que se trataba de familiares de dichos casos índice o individuos de familias previamente conocidas con mutación ya identificada.

Tras la obtención de los resultados genéticos, se sabe que 22 pacientes (de 21 familias distintas) son portadores de mutación truncante en el gen *PKD1* y 15 pacientes (correspondientes a 15 familias) de mutación no truncante en el mismo gen. Se identificó mutación en el gen *PKD2* en 25 pacientes (23 familias de la cohorte y 17 casos (17 familias) resultaron negativos, no identificándose ninguna variante probablemente asociada a la enfermedad en los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* (tabla del anexo 4 y figura 52).

Por tanto, del total de la cohorte, 62 pacientes (59 familias) son casos de ADPKD y 17 casos correspondientes a 17 familias son no resueltos genéticamente, para los genes estudiados.

A mayores, 2 individuos clínicamente no afectados estudiados en contexto familiar resultaron negativos para la mutación familiar, confirmándose que son casos de ADPKD (no se representan en la figura 52).

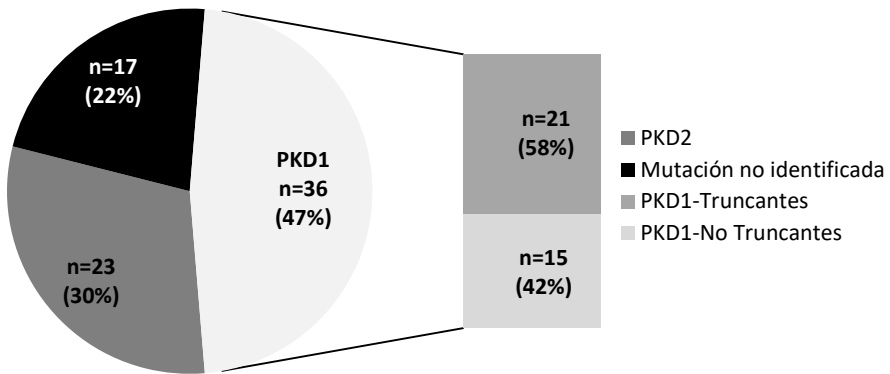


Figura 52. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUAC.

En resumen, un 61% de los las familias con diagnóstico positivo portan la mutación en el gen *PKD1* y un 39% en el gen *PKD2*.

Resultados generales para el Área Sanitaria A Coruña-Ferrol

Tras la obtención de los resultados de forma individualizada para cada uno de los dos hospitales, los datos obtenidos para el área sanitaria A Coruña-Ferrol fueron los siguientes:

- Un total de 72 pacientes (de 68 familias) son casos de ADPKD.
- Un 60% de las familias diagnosticadas portan mutación en el gen *PKD1*, un 38% en el gen *PKD2* y un 2% en otros genes (*GANAB*).
- Del total de la cohorte, 26 pacientes (26 familias) son casos no resueltos genéticamente, para los 3 genes estudiados en este trabajo.

En la figura 53 se muestra el número de pacientes no resueltos genéticamente que no cumplen criterios de inclusión para cada uno de los dos hospitales. Se observa que el 85% no cumplen los dichos criterios.

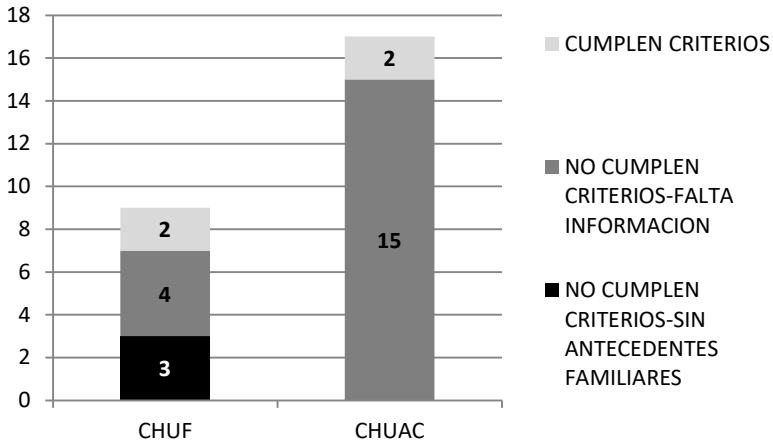


Figura 53. Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria A Coruña-Ferrol, se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético.

Área Sanitaria Santiago-Lugo

Se muestran los resultados obtenidos por cada hospital, para los 3 que forman el área sanitaria Santiago-Lugo:

Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS)

Se realizó el test de amplicones a 47 pacientes del total de las 125 muestras recibidas. En los demás casos se realizó estudio de segregación familiar, bien porque los demás individuos son familiares de estos casos índice o porque son individuos pertenecientes a familias ya conocidas y previamente diagnosticadas.

Se afirma, tras los estudios genéticos, que 23 pacientes (17 familias) son portadores de mutaciones truncantes en el gen

PKD1 y 20 (14 familias) de mutaciones de tipo no truncante en el mismo gen. Además, otros 41 pacientes (18 familias) portan la mutación en el gen *PKD2* y dos pacientes (1 familia) en el gen *GANAB* (figura 54 y tabla del anexo 4). Resultaron negativos para el test 27 pacientes de 21 familias distintas.

Por tanto, tras los resultados genéticos se confirma que 86 pacientes pertenecientes a 50 familias, enviadas desde el CHUS, resultaron ser casos/familias ADPKD, mientras que 21 familias que incluyen un total de 27 pacientes no fueron resueltas genéticamente. Los 12 individuos que faltan hasta el total de 125 muestras enviadas, eran individuos que no presentaban características compatibles con casos de ADPKD, y resultaron no portadores de la mutación familiar (no se representan en la figura 54).

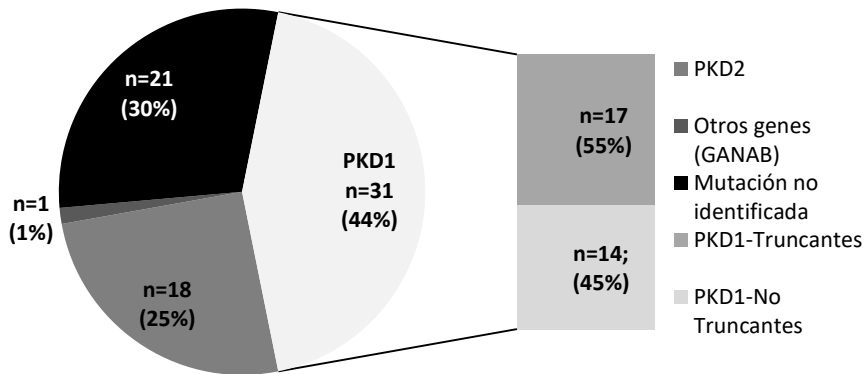


Figura 54. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUS.

Del total de pacientes con un diagnóstico genético concluyente, el 62% son portadores de mutación en el gen *PKD1*, el 36%

portan la mutación en el gen *PKD2* y el 2% en otros genes (*GANAβ*).

Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA)

Se sometieron a estudio genético mediante el test de amplicones a 36 pacientes de los 42 recibidos. Los otros 6 se analizaron en contexto familiar mediante estudio de segregación.

Se identificaron mutaciones de tipo truncante en el gen *PKD1* en 8 pacientes pertenecientes a 8 familias distintas, y mutaciones de tipo no truncante en 3 pacientes de 2 familias. Un total de 13 pacientes (13 familias) portaban mutación en el gen *PKD2* y 16 (13 familias) resultaron negativos para el test de amplicones, no identificándose ninguna variante probablemente patogénica asociada a enfermedad en ninguno de los 3 genes estudiados (figura 55 y tabla del anexo 4).

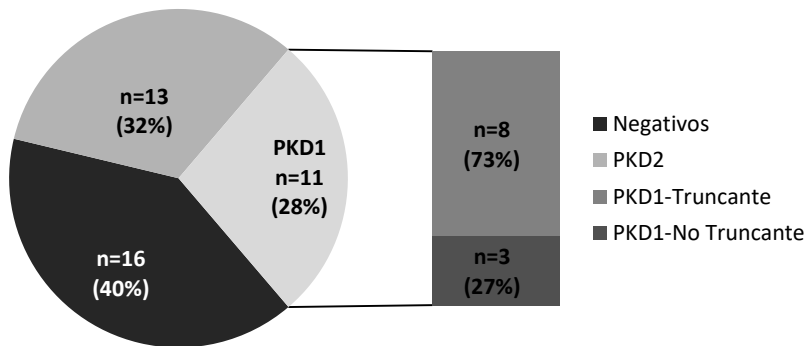


Figura 55. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el HULA.

Se incluyen además 2 individuos no afectos analizados mediante estudio de segregación y con resultado negativo, no siendo portadores de la mutación familiar. (no se representan en la figura 55). En concreto uno de estos pacientes pertenece a una familia (PKD_BUR507) para la cual el individuo probando de la familia fue enviado desde el H. da Costa (Burela).

Por tanto, a partir de esta cohorte caracterizamos a 24 pacientes pertenecientes a 23 familias como casos/familias ADPKD. De todas las familias diagnosticadas, el 43% portaban mutaciones en el gen *PKD1* y el 57% en el gen *PKD2*.

Hospital de Burela

Del total de pacientes recibidos para estudio genético, 21 fueron sometidos a test de amplicones, y los demás se analizaron como estudios de portadores en contexto familiar. Se identificaron mutaciones de tipo truncante en el gen *PKD1* en 9 pacientes pertenecientes a 5 familias; 4 pacientes (4 familias) eran portadores de mutaciones de tipo no truncante en el mismo gen y 10 pacientes de 7 familias portaban mutación en el gen *PKD2*. Además, 1 pacientes (1 familia) era portador una variante no truncante de significado incierto pero que cumple ciertos criterios de patogenicidad en el gen *GANA β* . En 8 pacientes (7 familias) no se identificó ninguna mutación asociada a la patología en ninguno de los 3 genes estudiados (figura 56 y tabla del anexo 4).

A mayores, 11 individuos clínicamente no afectos pertenecientes a alguna de las familias estudiadas mediante el test genético se analizaron mediante estudio de portadores y el resultado permitió concluir que no eran portadores de la mutación familiar y que por tanto no se trata de casos de ADPKD (estos resultados no se representa en la figura 56).

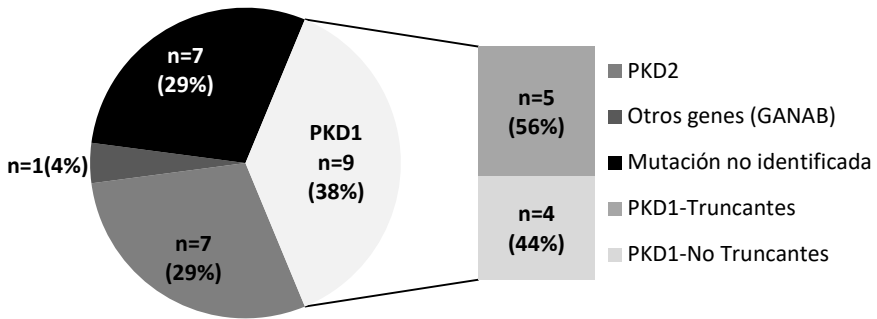


Figura 56. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el Hospital de Burela.

Por tanto, a partir de la cohorte de pacientes recibida desde el Hospital de Burela y en base a los resultados genéticos obtenidos, se concluye que 24 pacientes del total (17 familias) eran casos de ADPKD. Teniendo en cuenta las familias con diagnóstico genético positivo, el 53% eran portadoras de mutación en el gen *PKD1*, el 41% eran portadores de mutación en el gen *PKD2* y el 6% en otros genes (*GANAB*).

Resultados generales para el Área Sanitaria Santiago-Lugo

Tras la obtención de los resultados de forma individualizada para cada uno de los dos hospitales, los datos obtenidos para el área sanitaria Santiago-Lugo fueron los siguientes:

- Un total de 134 pacientes (de 90 familias) son casos de ADPKD.
- Un 56% de las familias diagnosticadas portan mutación en el gen *PKD1*, un 42% en el gen *PKD2* y un 2% en otros genes (*GANAB*).

- Del total de la cohorte, 51 pacientes (41 familias) son casos no resueltos genéticamente, para los 3 genes estudiados en este trabajo.

En la figura 57 se muestra el número de pacientes que, siendo no resueltos genéticamente, no cumplen criterios de inclusión en el proyecto. El 31% de dichos pacientes no cumplen los criterios de inclusión.

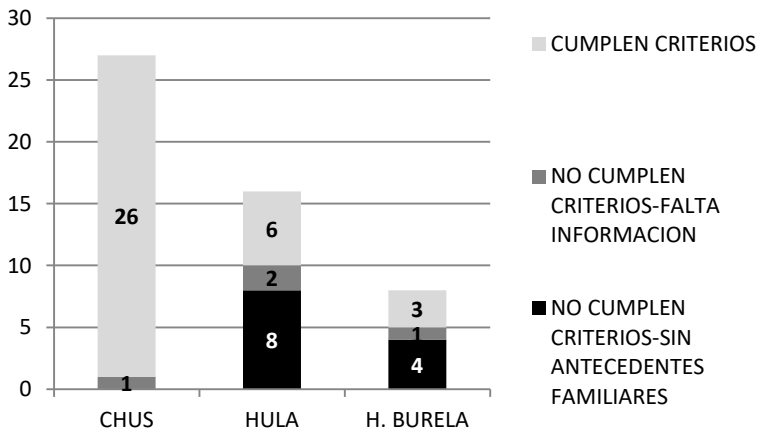


Figura 57. Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria Santiago-Lugo se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético.

Diagnóstico genético de todas las familias gallegas

Como se indica en el apartado de Registro, desde el año 2016 se recibieron un total de 309 familias nuevas procedentes de los distintos hospitales de referencia de Galicia. Sin embargo, en ese momento el Proyecto no partía de cero, sino que el laboratorio existía un registro histórico de familias PKD. En total, sumando las dos parte, actualmente se han caracterizado y diagnosticado a un total de 476 familias PKD.

El primer paso del diagnóstico fue realizar el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* al individuo probando de cada familia. En 16 familias que resultaron negativas para la primera prueba el estudio se completó mediante la realización del panel de HaloPlex para enfermedad quística común, rara y ultra-rara. Tras el resultado genético se identificó la mutación patogénica en 339 familias (71.2%). Las mutaciones de tipo truncante identificadas en el gen *PKD1* fueron las más prevalentes (123 de 476 o 25.8%), seguidas por las mutaciones de tipo no truncante (104 de 476 o 21.8%), y por las mutaciones identificadas en el gen *PKD2* (92 de 476 o 19.3%). En 4 familias (0.8%) *GANAB* fue el gen asociado a la enfermedad y en 16 familias (3.4%) las mutaciones se identificaron en otros genes asociados a PKD (figura 58) (*BBS4*, *DNAI1*, *HNF1B*, *INVS*, *PKHD1*, *RPI1*, *TCTN2*, *TSC2* y *UMOD*).

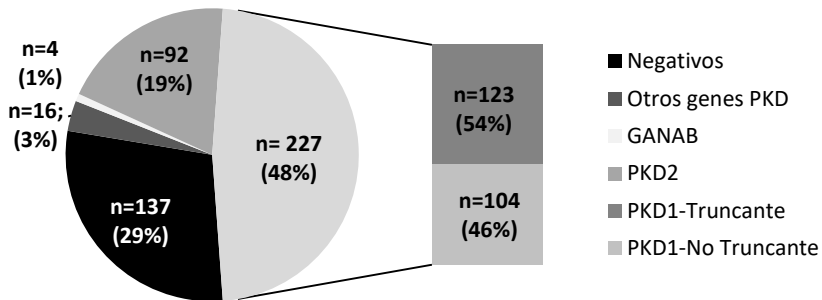


Figura 58. Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o negativo) y de los genes mutados para la cohorte de familias gallegas.

En el contexto de la población ADPKD, se han conseguido obtener un diagnóstico genético positivo, con mutación en los 3 genes asociados estudiados asociados a la enfermedad en 323 de las 476 familias. En dicha población de estudio, el gen más

prevalente fue *PKD1* (con un 70%) seguido de *PKD2* (28%) y *GANAB* (2%) obteniéndose unos porcentajes similares a los conocidos a través de la literatura para cohortes ADPKD. (En el anexo 5 se indican las familias del Registro Histórico NefroCHUS con mutación identificada)

Es de destacar que de todas las mutaciones identificadas en las familias, en el gen *PKD2* se han identificado dos que resultaron ser bastante recurrentes, identificándose en más de 5 familias que no se conoce que estén relacionadas (*PKD2*: c.2358+1G>T; *PKD2*: c.2509G>T: p.E837X) y otras dos que se identificaron en 10 o más familias (*PKD2*: c.595+1G>C; *PKD2*: c.1783dupA: p.A594fs). Además también se identificó una mutación en el gen *PKD1* que se repitió en 7 de las familias estudiadas (*PKD1*:c.8311G>A: p.E2771K).

Las mutaciones se clasifican en 5 categorías: frameshift *ins/del*, *in frame ins/del*, *nonsynonymous SNV*, *splicing* y *stopgain*. De todas las mutaciones identificadas en el gen *PKD1*, las más prevalentes fueron las *nonsynonymous SNV* representando el 40% (n=73), seguidas por las *frameshift ins/del* que representan el 30% (n=55). Se identificaron además 44 mutaciones de tipo *stopgain* (24%) 7 de tipo *in frame ins/del* (4%) y 2 de *splicing* (2%) (Figura 59).

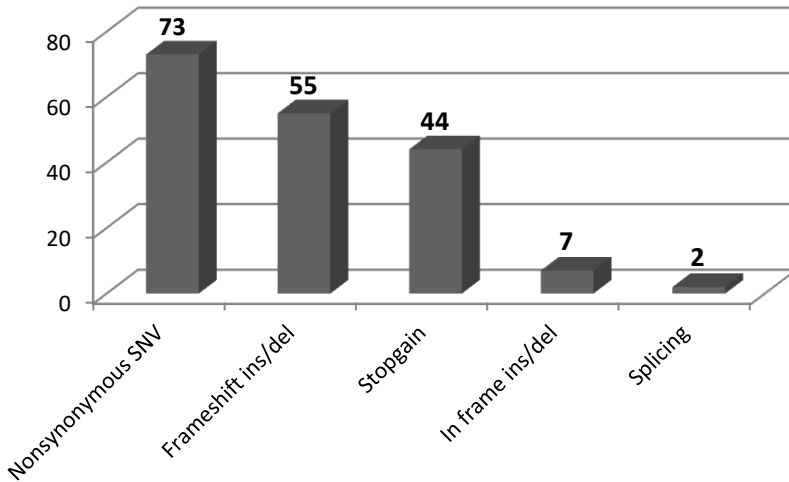


Figura 59. Clasificación de las variantes identificadas en el gen *PKD1* en cinco categorías: *nonsynonymous SNV*, *frameshift ins/del*, *stopgain*, *in frame ins/del* y *splicing*.

Sin embargo, el gen *PKD2* presentó menor tasa de mutagenicidad, ya que de todas las mutaciones identificadas, 13 (32.5%) fueron de tipo *frameshift ins/del*, siendo el grupo más prevalente, junto con las *stopgain* (13 o 32.5%). Le siguen las *nonsynonymous SNV*, con 8 mutaciones identificadas (20%) y por último las de *splicing* (6 o 15%) (Figura 60).

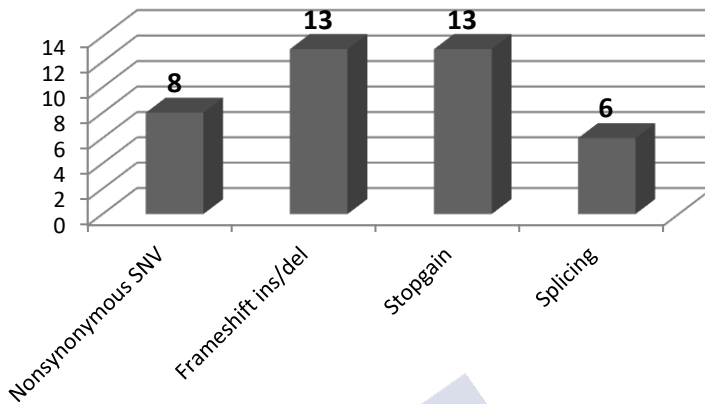


Figura 60. Clasificación de las variantes identificadas en el gen *PKD2* en cuatro categorías: *nonsynonymous SNV*, *frameshift ins/del*, *stopgain* y *splicing*.

4. Información clínica y establecimiento de los estudios de correlación genotipo-fenotipo

Se le ha solicitado a cada facultativo de referencia que junto con la muestra enviada para diagnóstico genético dentro del Proyecto nos envíen información clínica del paciente. Los parámetros que se pide que se cumplimenten son prácticamente los mismos que los del registro PQRAD de la Sociedad Española de Nefrología. De forma resumida se piden datos personales (nombre, apellido, sexo, fecha de nacimiento, edad, fecha de óbitos, estatura, peso, etnia, provincia y municipio), datos de diagnóstico (edad y motivo de diagnóstico), parámetros de función renal en el momento del diagnóstico (creatinina, CKD-EPI), estadio de enfermedad renal crónica (ERC) y año de entrada en terapia, presencia de eventos cardiovasculares, de aneurismas intracraneales, presencia de hipertensión arterial (HTA) y edad de detección de la misma y la presencia de otras manifestaciones extrarrenales como la presencia de quiste

hepáticos, hematuria, dolor lumbar, infección renal quística, infecciones urinarias, lesiones pancreáticas y divertículos meníngeos espinales entre otros.

No todos los facultativos cumplieron con el envío de la información. De esta forma, disponemos de datos clínicos de 175 pacientes procedentes del CHUS, de 80 pacientes del CHUOU, de 79 pacientes del CHUAC, de 59 pacientes del CHOP, 19 pacientes del CHUF, 10 pacientes del HULA, 10 pacientes del H. de Povisa, 7 pacientes del CHUVI y 7 del Hospital de Fátima, lo que suma un total de 446 pacientes.

Datos demográficos

De la cohorte total de 446 pacientes, el 45% (n=205) son hombres con una edad promedio de 51 años [1-92], y el 55% restante (n=245) son mujeres, con una media de edad de 51 años [15-92]. 7 de los pacientes de nuestra cohorte han fallecido.

Diagnóstico de la enfermedad y motivo de diagnóstico.

Se han clasificado a los pacientes en función de los la edad de diagnóstico fue anterior a los 20 años, entre los 20-40, entre los 41-60 e igual o más de 60.

Tal y como se observa en la figura, el 39.9% (n=178) de los pacientes presentan una edad de diagnóstico entre los 20-40 años y el 30.7% (n=137) entre los 41-60, siendo los dos grupos de edades con mayor número de individuos diagnosticados (figura 61). En toda la cohorte, la edad media de diagnóstico fueron los 38 años [1-80].

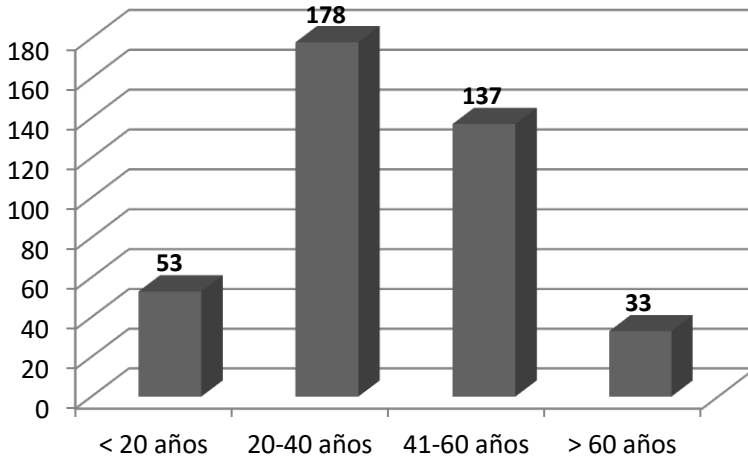


Figura 61. Representación de las edades de diagnóstico de los pacientes de la cohorte. Se representan por grupos de edad.

En cuanto al motivo de diagnóstico de la enfermedad, se establecieron una serie de criterios como: la sospecha familiar, examinación radiológica accidental, evento urológico, hipertensión, enfermedad renal crónica y desconocido. En base a esta clasificación, el principal motivo de diagnóstico de la cohorte, con un 59% (264) fue la sospecha familiar; un 16% (n=71) fueron diagnosticados accidentalmente mediante control radiológico; el 5% (n=23) mediante un evento urológico y otro 5% (n=22) por ERC y un 2% (n=7) por HTA. Para el 13% restante (n=59) el motivo de diagnóstico es desconocido (figura 62).

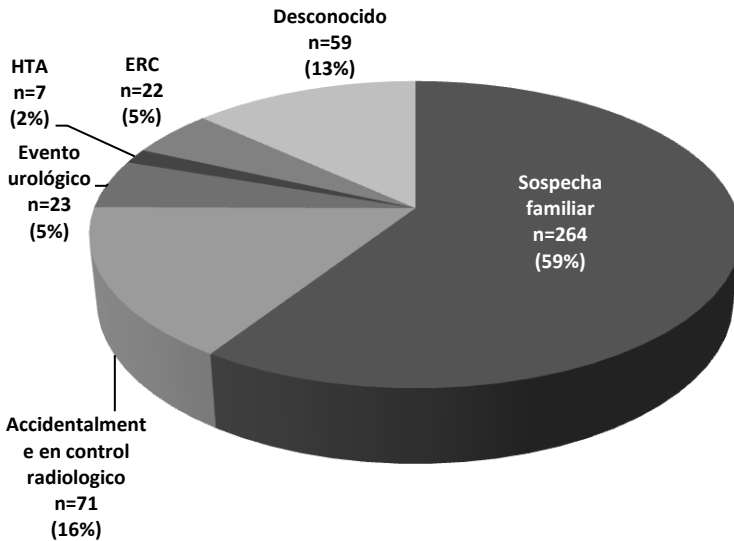


Figura 62. Representación de los principales motivos de diagnóstico para la cohorte de pacientes.

Efecto del sexo en el fenotipo ADPKD

La tasa de filtración glomerular ajustada a la edad (eGFR) se puede utilizar como un predictor de la severidad de la enfermedad. Se sabe que los hombres tienen menores valores de eGFR y por tanto, una enfermedad renal más severa que las mujeres.

A partir de los datos y mediante análisis estadístico lo primero que se determinó fue ver si las variables seguían una distribución normal. Para ello se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Liliefors. Como se muestra a continuación, tanto las variables edad como eGFR siguen una distribución normal (p valor > 0.05) (figuras 63 y 64).

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Edad	,039	439	,111	,995	439	,155

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura 63. Prueba de normalidad para la variable edad. Como el p valor es superior a 0.05 se considera que los datos cumplen los criterios de normalidad.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CKDEPI	,036	377	,200*	,986	377	,001

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura 64. Prueba de normalidad para la variable CK-EPI (ecuación utilizada para estimar la GFR). Como el p valor es superior a 0.05 se considera que los datos cumplen los criterios de normalidad.

A continuación, mediante el test T de Student se analizó si existían diferencias estadísticamente significativas entre la eGFR y el sexo para la cohorte de este estudio.

Se observó que los hombres presentaban un valor medio de eGFR menor que las mujeres para la cohorte analizada, pero no había diferencias estadísticamente significativas (figura 65).

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Sexo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
CKDEPI	Hombre	161	81,4796	32,97552	2,59884
	Mujer	216	86,9731	30,44487	2,07151

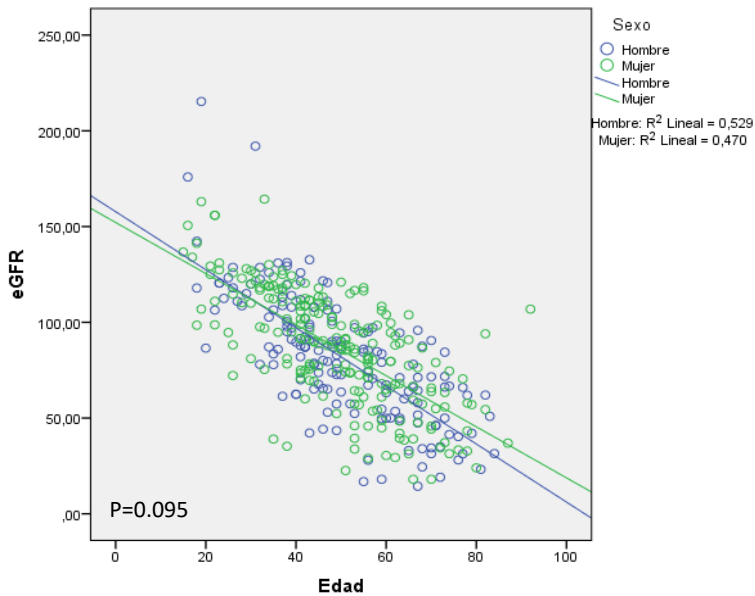


Figura 65. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics.

Posteriormente, se analizó la existencia de diferencias en la eGFR en función del sexo, pero por separado, para la cohorte de pacientes portadores de mutación en el gen *PKD1* y para los pacientes portadores de mutación en *PKD2*, ya que a través de la literatura se conoce que independientemente del gen mutado, los hombres presentan menores valores de eGFR que las mujeres.

En la cohorte de estudio, mediante el test T de Student se determinó que para ambos casos (tanto los PKD1 – figura 66- como los PKD2- figura 67-), los hombre presentaban menores eGFR que las mujeres pero no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Sexo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
eGFR	Hombre	86	88,3162	31,44946	3,39128
	Mujer	96	92,8504	32,88769	3,35659

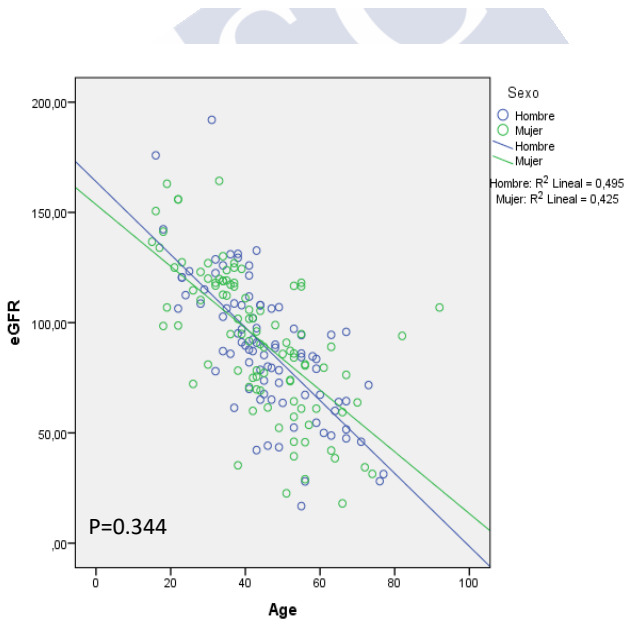


Figura 66. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la población de pacientes con mutación en el gen *PKD1*.

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Sexo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
eGFR	Hombre	35	79,5877	35,32059	5,97027
	Mujer	75	82,4864	28,02119	3,23561

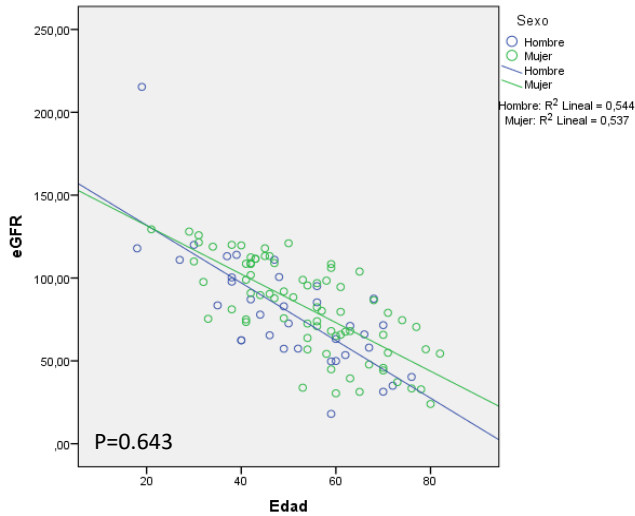


Figura 67. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la población de pacientes con mutación en el gen *PKD2*.

Efecto alélico. Tipo de mutación en *PKD1* y *PKD2*

Se sabe que las mutaciones de tipo truncante se asocian a valores más bajos de eGFR. En base a este conocimiento se analizaron los resultados de nuestra cohorte para ver si se observaban diferencias entre individuos portadores de mutaciones truncantes y no truncantes para los genes *PKD1* y *PKD2*.

En la figura 68 se observa la comparativa entre los valores de eGFR para los pacientes con mutaciones de tipo truncante y no truncante en el gen PKD1. El valor medio de eGFR obtenido para el tipo truncante es menor que para el tipo no truncante, sin embargo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (p valor= 0.400).

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Tipo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
eGFR	PKD1 Truncante	119	89,2403	32,37330	2,96766
	PKD1 No Truncante	63	93,4798	31,96457	4,02716

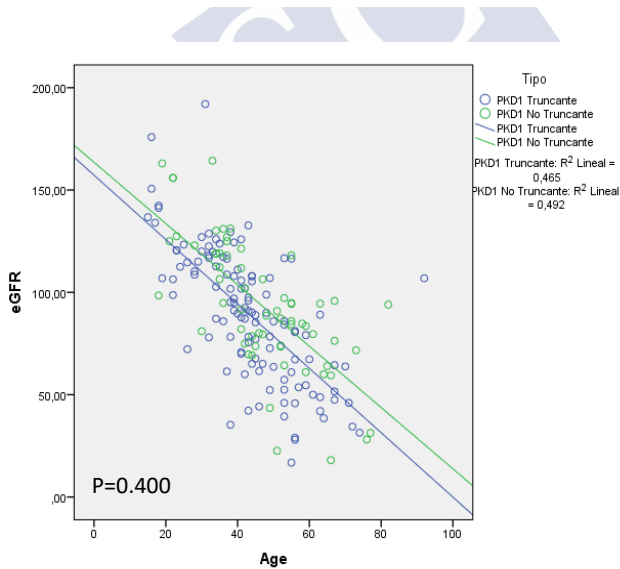


Figura 68. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para los pacientes con mutaciones *PKD1* truncantes y *PKD1* no truncantes

Para el gen *PKD2* ocurre lo mismo que en *PKD1*, se obtienen menores valores medios de eGFR para las mutaciones de tipo

truncante que para las no truncante, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas (p valor = 0.174). Además si se observa en patrón de la gráfica se ve que las dos rectas de regresión se cruzan, lo que significa que no se observa una diferencia estadística clara. Sin embargo, no es de extrañar este resultado ya que la n de los pacientes con mutación no truncante en el gen *PKD2* es muy pequeña ($n=12$) (figura 69).

Prueba T

Estadísticas de grupo

Tipo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
PKD2 Truncante	98	79,1946	26,27252	2,65393
PKD2 No Truncante	12	100,9150	51,10004	14,75131

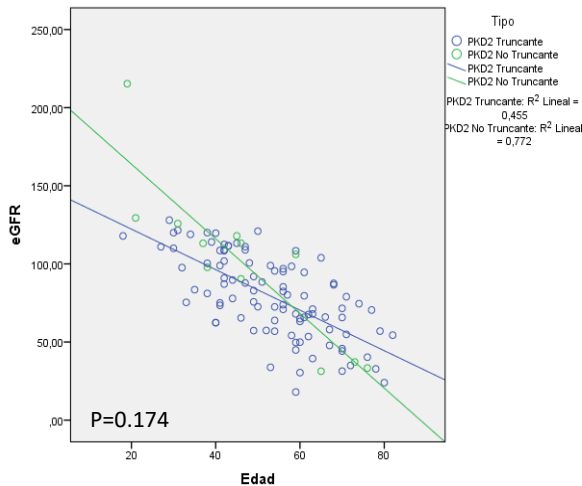


Figura 69. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para los pacientes con mutaciones PKD2 truncantes y PKD2 no truncantes

En base a los resultados obtenidos, y viendo que los valores medios de eGFR pueden indicar una tendencia de qué tipo de mutaciones y genes mutados se asocian a peor función renal, pero, sin embargo, los análisis estadísticos no muestran diferencias que sean estadísticamente significativas decido analizar y comparar si existe alguna diferencia entre las mutaciones de tipo truncante en el gen *PKD2* con las mutaciones de tipo truncante y no truncante en el gen *PKD1* con el objetivo de comprobar si en nuestra cohorte de pacientes las mutaciones de tipo truncante en el gen *PKD2* pueden causar un efecto fenotípico similar a las mutaciones en el gen *PKD1*.

Tras el análisis estadístico entre mutaciones truncantes para los genes *PKD1* y *PKD2* se observan menores valores medios de eGFR en pacientes portadores de mutaciones en el gen *PKD2*. Con un p valor de 0.014 se dice que la diferencia es estadísticamente significativa para los datos que estamos analizando. Sin embargo y visualizando la nube de puntos y las rectas de regresión de la gráfica, no se observan paralelas y no podemos observar una clara diferencia, sino que se ven las rectas cruzadas no mostrando una diferencia clara, dada, seguramente, por no disponer de una n grande para la población de pacientes con mutación de tipo truncante en los genes *PKD1* y *PKD2* (figura 70).

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Tipo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
eGFR	PKD1 Truncante	119	89,2403	32,37330	2,96766
	PKD2 Truncante	98	79,1946	26,27252	2,65393

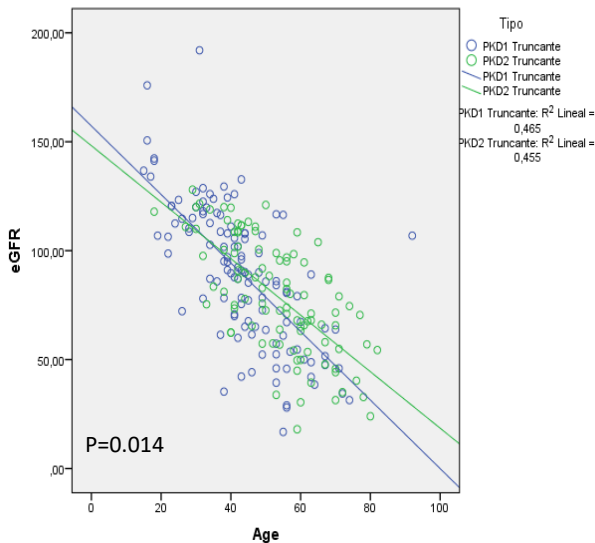


Figura 70. Representación y estadística de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la cohorte de pacientes de este estudio portadores de mutación de tipo truncante en los genes PKD1 y PKD2.

Algo similar ocurre cuando se realiza el análisis para comparar los valores de eGFR entre los pacientes con mutaciones de tipo no truncante en el gen *PKD1* y los individuos con mutaciones truncantes en el gen *PKD2*. Los valores medios obtenidos para eGFR asocian las mutaciones *PKD2* truncantes a un peor filtrado glomerular. El p valor obtenido ($p=0.02$) indica que los

datos son estadísticamente significativos a pesar de que en la gráfica no se observa una clara diferenciación entre las rectas de regresión (figura 71).

Prueba T

Estadísticas de grupo

	Tipo	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
eGFR	PKD1 No Truncante	63	93,4798	31,96457	4,02716
	PKD2 Truncante	98	79,1946	26,27252	2,65393

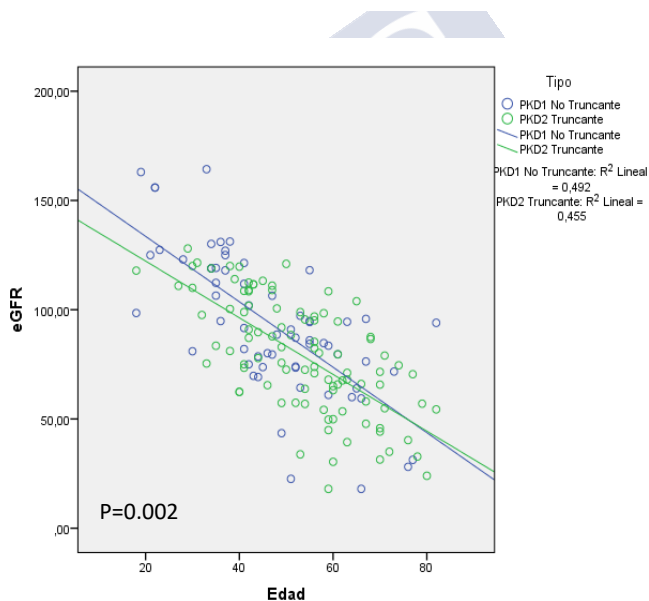


Figura 71. Representación y estadística de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la cohorte de pacientes de este estudio portadores de mutación de tipo truncante en los genes PKD1 y PKD2

Hipertensión arterial (HTA) como manifestación más frecuente en pacientes ADPKD y riesgo cardiovascular

Para la cohorte a analizar, el 73% de los pacientes (n=325) presentaron HTA a una edad media de detección de 42 años (6-82). En concreto, en el 14% (n=45) de los pacientes con HTA, la edad de detección fue precoz, igual o anterior a los 30 años. En el 73% de los casos (n=237) la edad de detección fue posterior a los 30 años y en el 13% restante de los casos (n=43) no disponemos de datos sobre la edad de diagnóstico.

Clasificando a los pacientes en base a los estadios de enfermedad renal crónica, en estadio 1, es decir, sin alteración en la función renal el 57% de los pacientes ya manifestaban HTA (figura 72), indicando que más de la mitad de los pacientes presentan la HTA como primer síntomas antes de que se altere su función renal.

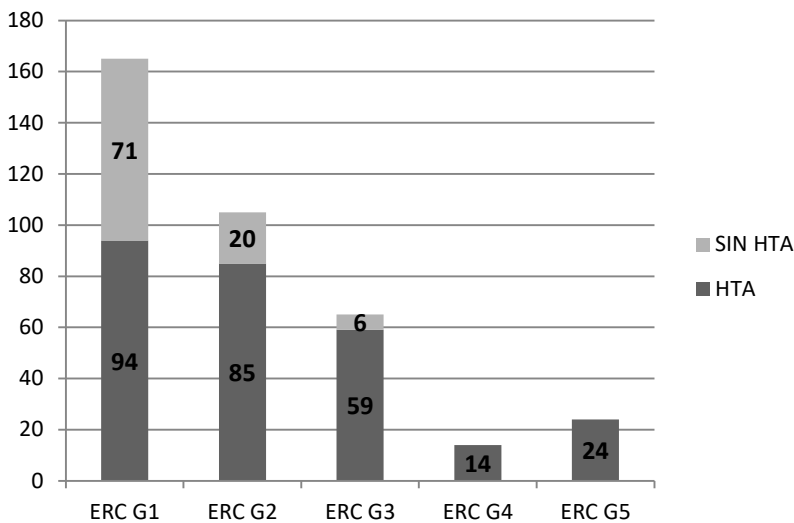


Figura 72. Clasificación de los pacientes en función del estadio de enfermedad renal crónica en el que se encuentran y dentro de cada estadio se clasifican en función de si manifiestan HTA o no.

Un 39% de toda la cohorte (n=39) presentaron algún tipo de evento cardiovascular. El más frecuente fue el infarto de miocardio, que lo padeció el 31% de los pacientes con algún tipo de evento cardiovascular (12 de 39). Los restantes 27 pacientes sufrieron diferentes tipos de eventos entre los que se encuentran la insuficiencia cardiaca, cardiopatía isquémica, fibrilación auricular, etc.

Terapia Renal Sustitutiva (TRS)

El 21% de los pacientes (n=92) iniciaron alguno de los modos de TRS con una media de edad de 49 años (38-80). En concreto 19 pacientes iniciaron diálisis peritoneal, 29 hemodiálisis y 44 fueron trasplantados (figura 73). En la figura aparece representados un total de 94 pacientes en lugar de 92, esa diferencia de 2 pacientes se trata de 2 individuos que fueron trasplantados pero perdieron el injerto y reiniciaron hemodiálisis.

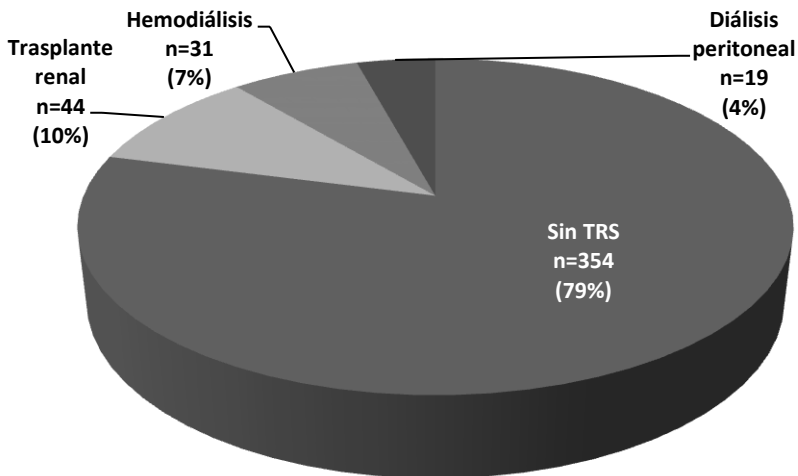


Figura 73. Representación de los pacientes de la cohorte de estudio en terapia renal sustitutiva.

Otras manifestaciones extrarrenales

Entre todas las manifestaciones extrarrenales que se conoce que pueden estar asociadas a ADPKD y que pueden agravar el fenotipo asociado a la enfermedad, se seleccionaron las más destacadas en función de la información clínica de la que se dispone. Con un porcentaje de un 67.9% (n=303) la presencia de quistes hepáticos es la segunda manifestación más frecuente (tabla) después de la presencia de HTA. El 27% de los pacientes (n=119) presentaron dolor lumbar. En menor porcentaje le sigue la infección renal quística (7.4%; n=33) y la presencia de aneurismas intracraneales (3.1%; n=14). En un 2% de los casos (n=9) se produjo hemorragia subaracnoidea y en un 1.3% (n=6) la intervención fue requerida (tabla 41). En el apartado de discusión se realizará la comparación entre la incidencia de estas manifestaciones entre los resultados obtenidos para la cohorte gallega y los resultados para la población española en general.

Tabla 41. Principales manifestaciones extrarrenales en la cohorte de estudio con ADPKD.

Manifestación Extrarrenal	Pacientes (%)
Quistes hepáticos	303 (67.9%)
Dolor lumbar	119 (27%)
Infección renal quística	33 (7.4%)
Aneurismas intracraneales	14 (3.1%)
Hemorragia subaracnoidea	9 (2%)
Intervención profiláctica	6 (1.3%)



DISCUSIÓN

1. Establecimiento de una estrategia de diagnóstico genético coste/efectiva para la enfermedad poliquística renal.

Hace años, el diagnóstico de la enfermedad se hacía en base a parámetros clínicos, diagnosticando a los pacientes, en la mayoría de los casos, cuando la enfermedad estaba en un estadio avanzado (Mosetti *et al.*, 2003). Sin embargo, el avance en el conocimiento de los genes asociados a las patologías y el avance en las técnicas de secuenciación del ADN hizo que el diagnóstico genético empezase a coger relevancia y se empezase a utilizar como una herramienta útil para proporcionar un diagnóstico certero, permitiendo adelantarse a la enfermedad y permitiendo definir un posible pronóstico de la misma. El diagnóstico genético empezó mediante la utilización de la secuenciación tradicional por método Sanger (Sanger *et al.*, 1977) como forma de diagnóstico, diagnosticando de forma individual y uno por uno cada uno de los genes conocidos asociados a la enfermedad.

Sin embargo, en los últimos años, la incorporación de las tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) revolucionaron el campo de la genética, superando las limitaciones en cuanto a tiempo y costes impuestas por la secuenciación tradicional por Sanger, así como aportando la ventaja de secuenciar genes en conjunto, importante en patologías como la Poliquistosis Renal, en la cual existe variabilidad dentro de la misma familia o entre distintos pacientes con la misma enfermedad que puede ser debida a la presencia de mutaciones adicionales en genes modificadores

(fenómeno de interacción génica) (García-González *et al.*, 2007; Bergmann *et al.*, 2011).

Se han publicado distintas estrategias para el diagnóstico de las enfermedades renales mediante las tecnologías NGS, utilizando distintas plataformas de secuenciación, como la plataforma *Illumina*. En algunos casos utilizan la secuenciación mediante paneles de genes y en otros casos mediante exomas o genomas completos, con el objetivo de identificar nuevos genes asociados a enfermedad (Cornec-Le Gall *et al.*, 2018). Recientemente, Hamad Ali y col. (Hamad *et al.*, 2019) publicaron resultados en donde comparan distintas estrategias para la secuenciación del gen *PKDI* asociado a ADPKD-tipo I, que van desde la secuenciación tradicional por método Sanger, a la utilización de paneles customizados diseñados mediante la tecnología HaloPlex y secuenciados mediante la plataforma *Illumina*, así como la realización de genomas y exomas completos.

Por tanto, y en base a las tecnologías de la que se dispone actualmente, el primer objetivo de este trabajo se centró en comparar diferentes tecnologías de secuenciación del ADN y establecer la estrategia más eficiente para el diagnóstico de la poliquistosis renal.

Nuestro grupo fue pionero en el desarrollo de estrategias para el diagnóstico de la enfermedad poliquística, desarrollando paneles de genes customizados mediante la tecnología HaloPlex (secuenciados por la plataforma Ion Torrent), que englobaban los genes conocidos hasta el momento asociados a PKD. Se desarrollaron, en un principio, dos paneles de genes diseñados en base a la incidencia poblacional de los genes: 1) panel que incluía los 8 genes conocidos asociados a las formas comunes de PKD y 2) panel que engloba los 72 genes asociados a las formas comunes, raras y ultra-raras de la enfermedad (ambos publicados en la tesis de Lisbeth Sousa).

Sin embargo, tras someter a controles (pacientes con mutación ya identificada mediante secuenciación por Sanger) a dichos

paneles HaloPlex, se pudo concluir que la tecnología no era eficiente para la región replicada del gen *PKDI*, debido a la presencia de los 6 pseudogenes, ya que las sondas no son capaces de capturar específicamente dicha región generando una elevada tasa de falsos negativos y falsos positivos. Lo contrario ocurre en el artículo publicado por Hamad Ali y col. (Hamad *et al.*, 2019) donde muestran un diagnóstico eficiente mediante dicha tecnología, con la diferencia de que la plataforma de secuenciación utilizada es *Illumina*.

En base a estos resultados se optó por diseñar una estrategia, basada en amplificar la región replicada del gen *PKDI* mediante PCR-LR utilizando primers específicos, para posteriormente tomar ventajas de las tecnologías NGS para la generación de librerías y poder ofrecer un diagnóstico más rápido y coste/efectivo que el que ofrece la secuenciación por Sanger.

En este trabajo, además de valerse de la estrategia ya previamente desarrolladas por el grupo, se mejoró la tecnología diseñando un panel con los 11 genes más comunes asociados a PKD que ya ha sustituido al de 8, y se desarrolló una estrategia basada en amplicones no solo para la región replicada del gen *PKD1*, sino para el gen *PKDI* entero y los genes *PKD2* y *GANAB*, los tres conocidos a ADPKD en ese momento, con el objetivo de disponer de un test para diagnosticar a una cohorte de pacientes ADPKD con una eficiencia del 100% incluso para el gen *PKDI*.

Con todas las herramientas disponibles planteamos dos estrategias de diagnóstico:

- La primera estrategia se basa en diagnosticar a pacientes remitidos al laboratorio con sospecha clínica de PKD mediante el panel de *HaloPlex* (8 genes, 11 o 72 en función de cuál sea la solicitud de diagnóstico) y comprobar si obtenemos un diagnóstico genético positivo. En caso contrario, a mayores se realiza el test de amplicones, exclusivamente, para la región replicada

del gen *PKD1*, para la cual las sondas *HaloPlex* no son eficientes.

- La segunda estrategia se basa en diagnosticar a los pacientes PKD (siempre y cuando no se sospeche clínicamente de una forma de poliquistosis poco común) mediante la estrategia de amplicones para los tres genes. En caso negativo se realizarían los paneles de *HaloPlex* de 8, 11 o 72 genes con el objetivo de identificar la mutación en otros genes.

Mediante el estudio de cohortes de pacientes con ambas estrategias, se observó que la tasa de diagnóstico más elevada se consiguió cuando los pacientes con sospecha clínica de PKD eran diagnosticados mediante el test de amplicones para los tres genes (*PKD1*, *PKD2* y *GANAB*), obteniéndose una tasa de diagnóstico del 67%. Posteriormente los casos negativos se sometieron a los paneles *HaloPlex*, consiguiéndose diagnosticar al 81% de la cohorte.

Por tanto, y en base a los resultados obtenidos, la segunda estrategia de diagnóstico propuesta demostró ser la más eficiente. En base al conocimiento de que en torno a un 77% de los pacientes poliquísticos portan mutación en el gen *PKD1*, si tenemos una estrategia que nos permite cubrir toda la región codificante del gen al 100% y a mayores, también analizamos los genes *PKD2* y *GANAB*, es de esperar que seamos capaces de diagnosticar a la mayoría de los pacientes PKD.

Además, también se han comparado estas tecnologías con la panelización mediante la tecnología *SureSelect* y con la secuenciación de exomas. Con el tiempo los costes de secuenciación van disminuyendo, lo que conlleva a un aumento en la profundidad de lectura, consiguiendo que los resultados de cobertura ($\geq 30X$) para las regiones codificantes de los genes obtenida mediante la secuenciación de exomas sea similar a la

obtenida mediante paneles. Sin embargo, ninguna de dichas estrategias disponibles comercialmente permite secuenciar la región replicada del gen *PKDI* al 100%.

2. Aplicación de la estrategia de diagnóstico genético a una población cerrada como es la población gallega con poliquistosis renal.

Una vez establecida la estrategia de diagnóstico genético, se ha aplicado dicha estrategia para estudiar a la población gallega con poliquistosis renal, a través del Proyecto “Acción Estratégica en Galicia para la Poliquistosis Renal”.

Se han aunado los esfuerzos de toda la nefrología gallega para establecer un modelo de estrategia poblacional (diagnóstico genético en cascada) coordinada entre los hospitales de referencia de la comunidad autónoma de Galicia, para poder identificar y registrar a las familias gallegas poliquísticas, diagnosticarlas genéticamente y establecer estudios de correlación genotipo-fenotipo que permitiesen mejorar el conocimiento de la enfermedad, todo ello a un coste reducido.

Registro de familias ADPKD:

Desde que comenzó el proyecto en el año 2016, hemos recibido 573 pacientes activos en las consultas de nefrología que corresponden a 309 familias. Sin embargo el proyecto no partía de cero, sino que en el laboratorio existían un registro histórico de familias distintas PKD que suman un total de 476 familias clínicamente caracterizadas como PKD.

Diagnóstico genético:

La realización de los estudios genéticos nos ha permitido establecer la tasa de mutagenicidad real de los genes en Galicia, permitiendo constituir de esta forma el mapa genético gallego para la enfermedad.

Del total de familias identificadas, tras el estudio genético podemos confirmar que 323 familias son casos de ADPKD. En cuanto a las tasas de mutagenicidad observadas por áreas sanitarias se ha visto que en el Sur de la Comunidad (Área Sanitaria Vigo-Ourense) las tasas de mutagenicidad de los genes coinciden con las tasas descritas para la población general (78% *PKD1*, 18% *PKD2* y 4% otros genes). Sin embargo en el norte de Galicia, se produce un cambio de forma que prácticamente el gen *PKD1* y el gen *PKD2* están mutados al 50%. Dado que Galicia es una región con una alta tasa de consanguinidad y una región endogámica, puede que exista algún factor genético que confiera protección frente al gen *PKD1* en esta región.

Información clínica y estudios de correlación genotipo-fenotipo:

Tasa de filtración glomerular (eGFR). Efecto en el sexo.

Tomando como referencia los datos publicados por Cornec-Le Gall *et al.*, 2019 y Heyer *et al.*, 2016 se sabe que los hombres tienen valores de eGFR significativamente más bajos que las mujeres. Cuando el estudio se realiza solo para la población con mutación en *PKD1* o en *PKD2* el resultado es el mismo, teniendo los hombres valores más bajos en ambos casos, y asociándose a una enfermedad renal más severa.

En los resultados obtenidos en este proyecto para la población gallega, los hombres presentan también menores valores medios de eGFR, pero no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres casos (ni en toda la cohorte,

ni en la población con mutación en *PKD1* ni en la población con mutación en *PKD2*.

Tasa de filtración glomerular (eGFR). Efecto alélico. Tipo de mutación en *PKD1* y *PKD2*.

En base al artículo de Heyer y col. (Heyer *et al.*, 2016) también se sabe que las mutaciones de tipo truncante, tanto en el caso del gen *PKD1* como del *PKD2* se asocian a menores tasas de eGFR y, por tanto, peor función renal.

En los datos que nosotros obtuvimos se observa lo mismo, los valores medios de eGFR son menores en las mutaciones de tipo truncante que en las no truncante, pero para la cohorte de este estudio los datos tampoco salieron significativos.

Por tanto, en base a los resultados, se realizó una última comparación estadística entre las mutaciones de tipo truncante en el gen *PKD2* y las mutaciones truncantes y no truncantes en *PKD1*. En la comparativa entre las *PKD2* truncantes y las *PKD1* truncantes con un p valor estadísticamente significativo se obtuvo que las truncantes de *PKD2* presentaban menores valores de eGFR, sin embargo las rectas de regresión en el gráfico no muestran esta clara diferencia.

En cuanto a la comparativa entre las *PKD1* no truncantes y *PKD2* truncantes se obtuvieron resultados similares a los anteriores, donde las *PKD2* truncantes se asocian a peor función renal con un p valor estadísticamente significativo.

Es cierto que el número de individuos de los que disponemos de datos para hacer estos estudios de correlación genotipo-fenotipo no es grande. Normalmente en estudios de estadística, para que se puedan obtener datos que sí sean significativos hacen falta n más grandes.

Hipertensión arterial (HTA) como manifestación más frecuente en pacientes ADPKD y riesgo cardiovascular

Comparando los datos obtenidos en cuanto a porcentaje de pacientes hipertensos (antes y después de los 30 años), la edad media de detección de HTA, incluso el porcentaje de pacientes con HTA y función renal normal, así como también porcentaje de pacientes con eventos cardiovasculares, no se observan grandes diferencias con los datos publicados para la cohorte española (SEN 2019).

Terapia renal sustitutiva (TRS)

Un 21% (n=92) de los paciente de nuestra cohorte entraron en alguno de los modos de terapia renal sustitutiva (44 fueron trasplantados, 31 entraron en hemodiálisis – 2 fueron trasplantados pero perdieron el injerto y reiniciaron hemodiálisis- y 19 entraron en diálisis peritoneal. En comparación con los datos publicados en el congreso SEN 2019, los porcentajes son similares, e excepción de los pacientes trasplantados, que incluso el porcentaje es mayor en Galicia (10% *versus* 4%).

Otras manifestaciones extrarrenales

La infección quística resulta ser la manifestación extrarrenal más frecuente, a parte de la hipertensión coincidiendo con los datos de la población española. Sin embargo, la prevalencia de aneurismas en la población española se estima en torno a un 8%, mientras que en la cohorte gallega es de 3.1%.

CONCLUSIONES

PRIMERA PARTE

1. En este trabajo se describe por primera vez, el desarrollo y aplicación de una estrategia de secuenciación NGS por amplicones específicos del gen *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*, y su aplicación en una cohorte de pacientes con ADPKD. Se han realizado distintas comparativas entre esta estrategia y las comúnmente aplicadas en rutina diagnóstica para la ADPKD por paneles de genes (*HaloPlex* y *SureSelect*) y secuenciación de exomas (*AmpliSeq Exome*, *Clinical Exome* y *Focused Exome*).
2. La estrategia de Secuenciación NGS por Amplicones específicos es la única de todas las estrategias utilizadas que muestra un porcentaje de cobertura del 100% (con una profundidad de lectura >30X) para el gen *PKD1*. Esto se justifica por la presencia de hasta 6 pseudogenes de alta homología que impiden una secuenciación específica del gen diana. Esta conclusión y estrategia podría ser extrapolable a otros genes causantes de otras patologías que presenten pseudogenes.
3. De cara a su aplicación en la rutina diagnóstica, se ha realizado la comparativa teniendo en consideración la tasa mutagénica de los genes asociados a ADPKD y el coste de las estrategias. Se han comparado: i) una estrategia por amplicones específicos que incluye exclusivamente región duplicada del gen *PKD1*; ii) la secuenciación por amplicones específicos de los genes más comunes de la ADPKD (genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*); iii) todos los genes más comunes en la

población asociados a enfermedad quística renal (*HaloPlex* 11 genes) y iv) todos y cada uno de los genes asociados a enfermedad quística conocidos (*HaloPlex* 72 genes y *Exomas*).

4. La utilización de una estrategia en dos fases que incluya una secuenciación inicial de los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* secuenciados por amplicones específicos (con una tasa de diagnóstico del 67% de los casos), seguida de la una ampliación del estudio en los restantes casos negativos ya sea por secuenciación *HaloPlex* con los 11 genes asociados a enfermedad quística renal más común o los 72 genes quísticos conocidos hasta el momento, ha demostrado ser la estrategia más eficiente descrita hasta el momento con una tasa de detección del 81% de los pacientes de una cohorte de ADPKD.
5. A pesar de ello, la tecnología *Haloplex* ha demostrado proporcionar una alta tasa de falsos positivos, obligando a utilizar la secuenciación por método Sanger para validar las variantes identificadas mediante dicha estrategia. La tasa de falsos positivos disminuye con la estrategia por amplicones, aunque también seguimos validando las variantes identificadas por Secuenciación Sanger.

SEGUNDA PARTE

6. Una vez identificada la estrategia idónea para el diagnóstico genético de la patología, se ha establecido la primera acción estratégica para la enfermedad Poliquística en una población cerrada (Comunidad Autónoma de Galicia, AEGal_PQRAD), con el fin de identificar la tasa real de incidencia poblacional, la tasa de mutación de los genes y establecer el mapa de las familias con Poliquistosis renal de Galicia. Todos los servicios de nefrología de los hospitales gallegos hemos

aunado esfuerzos para la identificación de 460 familias con ADPKD, de las cuales 70% han sido diagnosticadas. La tasa de mutagenicidad del gen *PKD1* en la población gallega con poliquistosis es del 49% (n=227), de las cuales el 54% son truncantes (potencialmente rápidos progresadores) y 46% no-truncantes (lentos progresadores). Para el *PKD2*, la tasa de mutagenicidad es del 20% (n=92). *GANAB* y las familias sin mutación conocida asociada a la enfermedad representan el 1% (n=4) y 30% (n=153), respectivamente. La AEGal_PQRAD establece por primera vez, la tasa de mutagenicidad de una población cerrada con sospecha clínica de poliquistosis renal.

7. El establecimiento del mapa genético de la poliquistosis renal en Galicia ha desenmascarado resultados que observan la posible existencia de tasas de mutagenicidad de los genes poliquísticos dependientes de población. Tras la agrupación de los resultados en base a las áreas sanitarias gallegas (Vigo-Ourense, A Coruña-Ferrol, Santiago-Lugo) se observa una tasa de mutagenicidad de los genes *PKD1* y *PKD2* distinta entre el Norte y el Sur de Galicia. Mientras que la tasa de mutagenicidad en el Sur de Galicia se asemeja a la de la hallada en distintos estudios en la población mundial (78% *PKD1*, 15% *PKD2* y 7% SMC), la tasa de mutagenicidad del gen *PKD1* del Norte de Galicia disminuye significativamente (40% *PKD1*, 28% *PKD2*, 1% *GANAB*, 31% SMC). Tras descartar posibles efectos fundadores, proponemos que este fenómeno puede ser consecuencia de un efecto de conservación genética producido por las barreras geográficas existentes históricamente en Galicia que fomentaron la consanguineidad, pudiendo producir un efecto protector de la alta tasa de mutagenicidad del gen *PKD1*. Futuros esfuerzos deberán destinarse a la validación de dicha hipótesis.

8. En la población gallega con poliquistosis Renal diagnosticada genéticamente, las principales manifestaciones extrarrenales asociadas a ADPKD identificadas coinciden con las Guías Clínicas Españolas para la Poliquistosis Renal Autosómica Dominante. La Hipertensión Arterial (HTA) se presenta como la primera manifestación extrarrenal más frecuente (el 73% de los pacientes estudiados presenta HTA), seguida por la presencia de quistes hepáticos (presentes en el 67.9% de los pacientes). Gracias a la AEGal_PQRAD se ha pasado de que el diagnóstico de los individuos con poliquistosis renal pase de ser por hallazgo accidental, a ser en base a antecedentes familiares y por estudio genético en cascada.
9. Se ha establecido un estudio de correlación genotipo/fenotipo en la población gallega con el objetivo de demostrar la existencia de diferencias entre sexo y tasa de filtración glomerular estimada (eGFR), siendo los hombres los que presentan menores valores de eGFR en comparación a las mujeres. En función al tipo de mutación que portan, los pacientes portadores de mutaciones en *PKD1* también presentan menores valores de eGFR en comparación a los portadores de mutaciones en *PKD2*. De igual manera, los individuos portadores de mutaciones de tipo truncante presentan una caída de la función renal más temprana que los que portan una no truncante. Sin embargo, y a diferencia de lo publicado en la literatura, estas diferencias fenotípicas no son lo suficientemente distintitas como para ser significativas. Dado que la poliquistosis renal autosómica dominante es recesiva a nivel celular, creemos que este “fenómeno de amortiguación” de los fenotipos, pueda ser reflejo de la disminución de la tasa de mutagenicidad de los genes poliquísticos observada poblacionalmente, siendo esta vez a nivel celular.

10. Tras la aprobación del Tolvaptan (única diana terapéutica que retrasa la progresión de la ADPKD en ensayos clínicos) como tratamiento para los llamados rápidos progresadores, y la publicación del PROPKD Score (modelo para detectar pacientes rápidos progresadores según el tipo de mutación causante y parámetros clínicos), la estrategia poblacional de diagnóstico genético propuesta en este trabajo se postula como la mejor alternativa coste-eficiente, y exportable a otras comunidades autónomas, para clasificar y detectar a los pacientes susceptibles de ser tratados en población general. De igual manera, en esta tesis ponemos de manifiesto que tanto la incidencia mutacional de los genes poliquísticos, como las manifestaciones fenotípicas, pueden verse alteradas por fenómenos genéticos poblacionales, especialmente en poblaciones conservadas genéticamente.





BIBLIOGRAFÍA

- Abbott KC, Agodoa LY. Polycystic kidney disease at end-stage renal disease in the United States: patient characteristics and survival. *Clin Nephrol* (2002) 57: 208-214
- Alam A, Perrone RD. Managing cyst infections in ADPKD: an old problem looking for new answers. *Clin J Am Soc Nephrol* (2009) 4:1154-1155
- Alam A, Perrone RD. Management of ESRD in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* (2010) 17: 164-172
- Ars E, Bernis C, Fraga G, Martínez V, Martins J, Ortiz A, et al; Spanish Working Group on Inherited Kidney Disease. Spanish guidelines for the management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* (2014) Suppl 4: 95-105.
- Audrézet, M.-P. *et al.* Autosomal dominant polycystic kidney disease: comprehensive mutation analysis of *PKD1* and *PKD2* in 700 unrelated patients. *Human mutation* (2012) 33:1239–50
- Bae KT, Tao C, Wang J et al. Novel approach to estimate kidney and cyst volumes using mid-slice magnetic resonance images in polycystic kidney disease. *Am J Nephrol* (2013) 38: 333-341
- Bergmann C, von Bothmer J, Ortiz Brüchle N, Venghaus A, Frank V, Fehrenbach H, et al. Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* (2011) 22(11):2047-56

- Besse W, Dong K, Choi J, Punia S, Fedeles SV, Choi M, et al. Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function. *J Clin Invest* (2017) 127(9):3558–3558
- Besse W, Chang AR, Luo JZ, Triffo WJ, Moore BS, Gulati A et al. *ALG9* Mutation Carriers Develop Kidney and Liver Cysts *J Am Soc Nephrol* (2019).
- Bingham, C & Hattersley, A. T. Renal cystic and diabetes syndrome resulting from mutations in hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association –European Renal Association* (2004) 19(11):2703-8.
- Blyth H, Ockenden BG. Polycystic disease of kidney and liver presenting in childhood. *J Med Genet* (1971) 8:257–284.
- Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* (2001) 74(3):333–41.
- Boletta, A. & Germino, G. Role of polycystins in renal tubulogenesis. *Trends in Cell Biology* (2003) 13(9):484–92.
- Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, et al. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* (1995) 4(4):575–82
- Chapman AB, Johnson AM, Ranguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* (1997) 8: 1292-1297

- Chauveau D, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Macnicol A, Gonzalo A, Grunfeld JP. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* (1994) 45:1140-1146
- Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA et al. Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int* (2008) 74: 1468-1479
- Cordido A, Besada L y García-González M. The Genetic and Cellular Basis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease—A Primer for Clinicians. *Front Pediatr* (2017) 5: 279
- Cornec-Le Gall E, Audrézet MP, Rousseau A, Hourmant M et al. The PROPKD Score: A New Algorithm to Predict Renal Survival in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27(3):942-51
- Cornec-Le Gall E, Torres VE & Harris PC Genetic complexity of autosomal dominant polycystic kidney and liver diseases. *J. Am. Soc. Nephrol* (2018) 29 (1):13–23
- Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG et al. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet* (2018) 102(5):832-844
- Davila, S. *et al.* Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genetics* 36(6):575-7
- Decramer, S. *et al.* Anomalies of the *TCF2* gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology* (2007) 18(3):923-33
- Deget F, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K. Course of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) in siblings:

- a clinical comparison of 20 sibships. *Clin Genet* (1995) 47(5):248-53
- Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: Variations on the theme “ductal plate malformation. *Hepatology* (1992) 16(4):1069-83
- Ecdler T, Schrier RW. Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol* (2001) 12: 194-200
- Garcia-Gonzalez, M. *et al.* Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Human molecular genetics* (2007) 16(16):1940-50
- Gerdes J, Davis E, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis and disease. *Cell* (2009) 137(1):32–45
- Germino, G.G., Linking cilia to Wnts. *Nat Genet* (2005) 37(5):455-7
- Gevers TJ, Drenth JP. Diagnosis and management of polycystic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2013) 10: 101-108
- Grantham JJ. Clinical practice: autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* (2008) 359(14):1477–85
- Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot a P, Herrin J, Holleman R, Irons D a, Primack W. The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* (1995) 56:1101–1107

- Guay-Woodford LM. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the prototype of the hepato-renal fibrocystic diseases. *J Pediatr Genet* (2014) 3(2):89-101
- Hamad Ali, Fahd Al-Mulla, Naser Hussain, et al. *PKDI* Duplicated regions limit clinical Utility of Whole Exome Sequencing for Genetic Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (2019). 9(1):4141
- Hanaok K, Qian F, Boletta A, Bhunia A, Piontek K, Tsiokas L, et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable current. *Nature* (2000) 408(6815):990–4
- Harris PC, Bae KT, Rossetti S, Torres VE, Grantham JJ, Chapman AB, et al. Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* (2006) 17(11):3013–9
- Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* (2009) 60:321–37
- Harris PC, Rossetti S. Determinants of renal disease variability in ADPKD. *Adv Chronic Kidney Dis* (2010) 17:131-139
- Harris PC, Hopp K. The mutation, a key determinant of phenotype in ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* (2013) 24:868–870
- Heyer CM, Sundsbak JL, Abebe KZ, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, et al. Predicted mutation strength of nontruncating PKD1 mutations aids genotype-phenotype correlations in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27(9):2872–84
- Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med* (2011) 364(16):1533–43

- Hofherr A, Köttgen M. TRPP channels and polycystins. *Adv Exp Med Biol* (2011) 704:287–313
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, et al. The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* (1995) 10(2):151–60
- Igarashi P. Genetics and Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* (2002) 13:2384–2398
- Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of adult polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* (1983) 2: 630-639
- Irazabal MV, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Osborn SL, Harmon AJ, Sundsbak JL, et al. Imaging classification of autosomal dominant polycystic kidney disease: a simple model for selecting patients for clinical trials. *J Am Soc Nephrol* (2015) 26(1):160–72
- Jouret F, Lhommel R, Devuyst O et al. Diagnosis of cyst infection in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: attributes and limitations of the current modalities. *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27: 3746-3751
- Lanktree M, Haghighi A, Guiard E, et al. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *J Am Soc Nephrol* (2018) 29(10): 2593–2600
- Lee K., Battini L, Gusella G. Cilium, centrosome and cell cycle regulation in polycystic kidney disease. *BiochimBiophys Acta* (2011) 1812(10):1263-71
- Li A, Davila S, Furu L, Qian Q, Tian X, Kamath PS, King BF, Torres VE, Somlo S. Mutations in *PRKCSH* cause isolated autosomal dominant polycystic liver disease. *Am J Hum Genet.* (2003) 72(3):691-703

- Loftus H, Ong AC. Cystic kidney diseases: many ways to form a cyst. *Pediatr Nephrol* (2013) 28(1):33–49
- Lu H, Rondón-Galeano M, Ott E, Kaeslin G, Kausalya P, Kramer C, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet* (2017) 49(7):1025–34
- Luciano RL, Dahl NK. Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrol Dial Transplant* (2014) 29: 247-254
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* (2013) 31: 1281-1357
- Martinez V, Comas J, Arcos E et al. Renal replacement therapy in ADPKD patients: a 25-year survey based on the Catalan registry. *BMC Nephrol* (2013) 14: 186
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* (1996) 272(5266):1339-42
- Mosetti MA, Leonardou P, Motohara T, Kanematsu M, Armao D, Semelka RC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: MR imaging evaluation using current techniques. *J Magn Reson Imaging* (2003) 18(2):210–5
- Mosetti, M.A., et al., Autosomal dominant polycystic kidney disease: MR imaging evaluation using current techniques. *J Magn Reson Imaging* (2003) 18(2): p. 210-5

- Norby SM, Torres VE. Complications of autosomal dominant polycystic kidney disease in hemodialysis patients. *Semin Dial* (2000) 13: 30-35
- Onuchic, L.F., et al., *PKHD1*, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet*, (2002) 70(5):1305-17
- O'Neill WC, Robbin ML, Bae KT et al. Sonographic assessment of the severity and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease: the Consortium of Renal Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease (CRISP). *Am J Kidney Dis* (2005) 46: 1058-1064
- Pei Y. Diagnostic approach in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* (2006) 1(5):1108-14
- Perrone RD, Ruthazer R, Terrin NC. Survival after end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease: contribution of extrarenal complications to mortality. *Am J Kidney Dis* (2001) 38: 777-784
- Perrone RD, Abebe KZ, Schrier RW et al. Cardiac magnetic resonance assessment of left ventricular mass in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* (2011) 6: 2508-2515
- Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 17: 173-180 64. Drenth JP, Chrispijn M, Nagorney DM, Kamath PS, Torres VE. Medical and surgical treatment options for polycystic liver disease. *Hepatology* (2010) 52: 2223-2230

- Porath B, Gainullon VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. Mutations in *GANAB*, encoding glucosidase II α subunit, cause autosomal dominant polycystic kidney disease and liver disease. *Am J Hum Genet* (2016) 98(6):1193–207
- Qian, F. *et al.* PKD1 interacts with *PKD2* through a probable coiled-coil domain. *Nature genetics* (1997) 16(2):179-83
- Reis-Filho, J. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research* (2009) 11(Suppl 3):S12
- Ring T, Spiegelhalter D. Risk of intracranial aneurysm bleeding in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* (2007) 72: 1400-1402
- Rossetti S, Harris PC. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* (2007) 18:1374–1380
- Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* (2009) 75: 848-855
- Rossetti S, Hopp K, Sikkink RA et al. Identification of gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeted resequencing. *J Am Soc Nephrol* (2012) 23(5): 915–933
- Sancak, O. *et al.* Mutational analysis of the *TSC1* y *TSC2* genes in a diagnostic setting: genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in tuberous sclerosis complex. *European journal of human genetics* (2005) 13:731–741
- Sanger, F., et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* (1977) 265(5596): p. 687-95

- Schrier RW, Johnson AM, McFann K, Chapman AB. The role of parental hypertension in the frequency and age of diagnosis of hypertension in offspring with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* (2003) 64: 1792-1799
- Symmons O, Varadi A, Aranyi T. How segmental duplications shape our genome: recent evolution of ABCC6 and PKD1 Mendelian disease genes. *Mol Biol Evol* (2008) 25 (12) :2601-2613
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* (1994) 78(4):725
- Torra R Apuntes sobre el uso de tolvaptán para la poliquistosis renal autosómica dominante. Fundación Puigvert GTERH-SEN. WGIKD-EDTA
- Torres VE, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW. Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* (1993) 22: 513-519
- Torres VE, Harris PC, Pearson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* (2007) 369(9569):1287–301
- Torres, V. Role of vasopressin antagonists. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* (2008) 3 (4) 1212-1218
- Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa HB, Ouyang J, Czerwiec FS; TEMPO 3:4 Trial Investigators. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* (2012) 367(25):2407-18

- Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al. Tolvaptan in Later-Stage Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* (2017) 377(20):1930-1942
- Uliniski, T. *et al.* Renal phenotypes to hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations in a pediatric cohort. *Journal of the American Society of Nephrology* (2006) 17(2):497-503
- Vujic M, Heyer CM, Ars E et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles mimic the renal manifestations of ARPKD. *J Am Soc Nephrol* (2010); 21: 1097-1102
- Wallace, D. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *BiochimBiophysActa* (2011) 1812(10):1291-300
- Watnick, T. *et al.* Somatic Mutation in Individual Liver Cysts Supports a Two-Hit Model of Cystogenesis in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Molecular Cell* (1998) 2(2):247-51
- Wilson P. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* (2004) 350(2):151-64
- Yorder B, Hou X, Guay-Woodford L. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* (2002) 13(10):2508-16



ANEXOS

ANEXO 1

Genes incluidos en cada uno de los diseños:

- Panel de enfermedad quística común (8 genes): *GANAB*, *HNF1 β* , *PKD1*, *PKD2*, *PKHD1*, *PRKCSH*, *TSC1*, *TSC2*
- Panel de enfermedad quística común (11 genes): *GANAB*, *HNF1 β* , *MUC1*, *PKD1*, *PKD2*, *PKHD1*, *PRKCSH*, *REN*, *TSC1*, *TSC2*, *UMOD*
- Panel para enfermedad quística común, rara y ultra-rara (72 genes): *AH11*, *ALMS1*, *ARL13B*, *ARL6*, *B9D1*, *B9D2*, *BBS1*, *BBS10*, *BBS12*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS9*, *CC2D2A*, *CEP290*, *CEP41*, *DNAH11*, *DNAH5*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DYNC2H1*, *EVC*, *GLIS2*, *GUCY2D*, *HIF1A*, *HNF1B*, *IFT80*, *INPP5E*, *INVS*, *IQCB1*, *KIF7*, *LZTFL1*, *MKKS*, *MKS1*, *NEK1*, *NEK8*, *NPHP1*, *NPHP3*, *NPHP4*, *OFD1*, *PKD1*, *PKD2*, *PKHD1*, *PRKCSH*, *RP1*, *RPE65*, *RPGR*, *RPGRIP1L*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SDCCAG8*, *SEC63*, *SEPT7*, *TCTN1*, *TCTN2*, *TMEM138*, *TMEM216*, *TMEM237*, *TMEM67*, *TRIM32*, *TSC1*, *TSC2*, *TTC21B*, *TTC8*, *TXNDC3* (*NME8*), *UMOD*, *VHL*, *WDPCP*, *WDR19*, *WDR35*, *XPNPEP3*



ANEXO 2

Porcentajes de cobertura obtenidos *In Silico* para el panel de enfermedad quística común de 8 genes.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura <i>In Silico</i> (1X)
<i>HNF1B</i>	17	9	1854	100
<i>PKD1</i>	16	46	13829	94,03
<i>PKD2</i>	4	15	3207	99,93
<i>PKHD1</i>	6	67	13545	100
<i>PRKCSH</i>	19	17	1898	100
<i>SEC63</i>	16	21	2703	100
<i>TSC1</i>	9	23	3915	100
<i>TSC2</i>	16	42	6244	98,12

Porcentajes de cobertura obtenidos *In Silico* para el panel de enfermedad quística común de 11 genes.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura <i>In Silico</i> (1X)
<i>GANAB</i>	11	25	3401	99,81
<i>HNF1B</i>	17	9	1854	100
<i>MUC1</i>	1	9	1608	95,01
<i>PKD1</i>	16	46	13829	93,97
<i>PKD2</i>	4	15	3207	99,93
<i>PKHD1</i>	6	67	13545	100
<i>PRKCSH</i>	19	17	1898	98,44
<i>SEC63</i>	16	21	2703	100
<i>TSC1</i>	9	23	3915	100
<i>TSC2</i>	16	42	6244	98,12
<i>UMOD</i>	16	11	2242	100

Porcentajes de cobertura obtenidos *In Silico* para el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes.

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura <i>In Silico</i> (1X)
AHI1	6	26	4111	99,84
ALMS1	2	23	12964	99,31
ARL13B	3	10	1487	100
ARL6	3	8	742	100
B9D1	17	7	755	100
B9D2	19	3	588	100
BBS1	6	17	2122	98,23
BBS10	12	2	2212	100
BBS12	4	2	4306	100
BBS2	16	17	2506	100
BBS4	15	16	1880	100
BBS5	2	12	1266	91,36
BBS7	4	19	2528	100
BBS9	7	22	3104	99,72
CC2D2A	4	36	5583	100
CEP290	12	53	8500	99,62
CEP41	7	11	1342	98,61
DNAH11	7	82	15191	99,12
DNAH5	5	79	15455	99,93
DNAI1	9	20	2500	100
DNAI2	17	13	2210	100
DYNC2H1	11	90	14745	99,82
EVC	4	21	3399	99,81
GLIS2	16	6	1695	100
GUCY2D	17	18	3672	100
HIF1A	14	15	2781	99,87
HNF1B	17	9	1858	100
IFT80	3	19	2714	99,94
INPP5E	9	10	2135	98,24
INVS	9	16	3518	99,98
IQCB1	3	13	2057	99,89
KIF7	15	18	4392	100
LZTFL1	3	10	1100	100
MKKS	20	4	1973	100
MKS1	17	18	2040	100

Gen	Cromosoma	Exones	Tamaño (bp)	% Cobertura <i>In Silico</i> (1X)
NEK1	4	34	4541	99,96
NEK8	17	15	2379	100
NME8	7	15	2067	99,17
NPHP1	2	20	2602	98,89
NPHP3	3	27	4533	99,66
NPHP4	1	29	4861	100
OFD1	X	23	3499	100
PKD1	16	46	13829	94,03
PKD2	4	15	3207	99,93
PKHD1	6	67	13545	100
PRKCSH	19	17	1898	100
RP1	8	3	6531	100
RPE65	1	14	1882	100
RPGR	X	19	2828	92,15
RPGRIP1L	16	26	4468	98,01
RSPH4A	6	6	2271	100
RSPH9	6	6	1041	100
SDCCAG8	1	20	3961	99,97
SEC63	16	21	2703	100
SEPT7	7	13	1572	99,43
TCTN1	12	14	2002	97,47
TCTN2	12	18	2454	98,12
TMEM138	11	4	569	99,85
TMEM216	11	5	538	100
TMEM237	2	12	1443	100
TMEM67	8	28	3548	99,67
TRIM32	9	2	1982	100
TSC1	9	23	3915	100
TSC2	16	42	6244	98,12
TTC21B	2	29	4531	99,99
TTC8	14	15	1848	100
UMOD	16	12	2242	100
VHL	3	3	702	98,63
WDPCP	2	18	2601	92,18
WDR19	4	36	4749	100
WDR35	2	28	4106	100
XPNPEP3	22	10	1724	97,95



ANEXO 3. Comparativa de coberturas mediante distintas tecnologías

Gene	Targeted Region Coverage (%) (≥30X)					
	HaloPlex Technology	Amplicons Technology	SureSelect Technology	AmplSeq Exome	Clinical Exome	Focused Exome
GANAB	99.9	100.0	100.0	96.1	92.9	N/A
HNF1B	99.2	N/A	99.9	96.9	96.4	100.0
MUC1	80.0	N/A	98.7	90.6	73.1	98.3
PKD1	78.1	100.0	94.0	88.7	90.7	20.6
PKD2	96.9	100.0	88.4	73.5	86.3	94.9
PKHD1	99.2	N/A	100.0	96.2	99.3	98.6
PRKCSH	99.4	N/A	100.0	84.7	96.2	99.8
SEC63	98.8	N/A	100.0	92.4	98.3	91.6
TSC1	98.4	N/A	100.0	94.6	99.3	99.6
TSC2	96.3	N/A	99.8	97.2	99.5	99.6
UMOD	97.9	N/A	100.0	99.6	100.0	100.0
AH11	95.6	N/A	N/A	85.6	94.9	90.0
ALMS1	97.0	N/A	N/A	90.9	97.1	96.1
ARL13B	99.4	N/A	N/A	60.8	99.7	95.4
ARL6	85.0	N/A	N/A	74.7	99.8	99.0
B9D1	99.7	N/A	N/A	99.7	97.6	98.1
B9D2	100.0	N/A	N/A	98.8	99.0	100.0
BBS1	99.9	N/A	N/A	97.8	95.6	99.7
BBS10	97.1	N/A	N/A	89.6	99.9	99.9
BBS12	100.0	N/A	N/A	91.8	100.0	95.8
BBS2	98.6	N/A	N/A	96.1	99.7	98.8
BBS4	89.3	N/A	N/A	65.7	98.4	87.9
BBS5	99.9	N/A	N/A	81.4	98.8	98.8
BBS7	98.3	N/A	N/A	85.8	100.0	99.2
BBS9	99.1	N/A	N/A	84.2	100.0	97.4
CC2D2A	98.1	N/A	N/A	93.2	89.5	98.2
CEP290	91.9	N/A	N/A	68.6	99.6	97.5
CEP41	99.4	N/A	N/A	88.6	92.3	99.9
DNAH11	96.2	N/A	N/A	87.2	91.9	95.5
DNAH5	99.2	N/A	N/A	91.0	99.6	96.5
DNAI1	99.6	N/A	N/A	98.5	87.8	100.0
DNAI2	96.9	N/A	N/A	92.4	98.8	99.9
DYNC2H	96.3	N/A	N/A	82.1	94.2	98.5
EVC	90.9	N/A	N/A	91.1	87.6	94.3
GLIS2	99.9	N/A	N/A	92.6	94.2	99.9
GUCY2D	99.0	N/A	N/A	92.4	61.7	100.0
HIF1A	99.5	N/A	N/A	94.6	93.2	99.3
IFT80	97.3	N/A	N/A	83.4	93.1	98.2
INPP5E	97.8	N/A	N/A	97.7	93.4	99.8
INVS	98.5	N/A	N/A	80.4	99.3	100.0
IQCB1	96.2	N/A	N/A	88.2	99.8	97.1
KIF7	94.6	N/A	N/A	92.2	92.6	97.0
LZTFL1	99.9	N/A	N/A	86.8	94.8	99.3
MKKS	99.1	N/A	N/A	94.8	97.2	99.4
MKS1	99.8	N/A	N/A	100.0	98.6	99.0
NEK1	97.0	N/A	N/A	75.0	93.5	99.3
NEK8	99.9	N/A	N/A	100.0	97.1	100.0
NME8	96.6	N/A	N/A	91.9	99.9	98.5
NPHP1	99.8	N/A	N/A	95.0	97.3	98.8
NPHP3	98.0	N/A	N/A	81.1	99.4	95.4
NPHP4	96.5	N/A	92.3	93.2	61.9	98.3
OFD1	99.0	N/A	N/A	71.0	93.7	75.8
RP1	97.3	N/A	N/A	91.6	100.0	100.0
RPE65	100.0	N/A	N/A	89.9	94.8	99.9
RPGR	94.7	N/A	N/A	65.7	91.5	80.7
RPGRI1	94.5	N/A	N/A	85.5	85.0	96.4
RSPH4A	96.6	N/A	N/A	89.3	100.0	95.8
RSPH9	100.0	N/A	N/A	95.1	64.6	100.0
SDCCAG	99.3	N/A	N/A	91.7	94.0	92.1
SEPT7	99.0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TCTN1	99.9	N/A	N/A	89.4	98.5	98.8
TCTN2	95.6	N/A	N/A	93.5	99.7	94.6
TMEM13	100.0	N/A	N/A	50.7	100.0	100.0
TMEM21	100.0	N/A	N/A	99.6	100.0	95.1
TMEM23	96.8	N/A	N/A	74.9	100.0	99.9
TMEM67	98.4	N/A	N/A	82.4	100.0	99.9
TRIM32	100.0	N/A	N/A	87.8	99.0	100.0
TTC21B	96.7	N/A	99.8	77.2	95.7	98.6
TTC8	94.3	N/A	N/A	86.8	96.6	97.0
VHL	91.8	N/A	N/A	100.0	78.2	100.0
WDPCP	95.2	N/A	N/A	94.6	100.0	98.4
WDR19	99.3	N/A	N/A	88.5	100.0	97.7
WDR35	96.2	N/A	N/A	78.6	99.3	96.0
XPNPEP3	100.0	N/A	100.0	95.1	99.8	93.4



ANEXO 4

Variantes identificadas en las muestras recibidas desde los distintos hospitales de Galicia:

Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHOP)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2821	PKD_CHUP237	PKD1	c.6397_6399del	p.2133_2133del	Nonframeshift deletion	No truncada
3058	PKD_CHUP237	PKD1	c.6397_6399del	p.2133_2133del	Nonframeshift deletion	No truncada
2822	PKD_CHUP237	PKD1	c.6397_6399del	p.2133_2133del	Nonframeshift deletion	No truncada
3549	PKD_CHUP237	PKD1	c.6397_6399del	p.2133_2133del	Nonframeshift deletion	No truncada
2744	PKD_CHUP290	PKD1	c.3671_3675del	p.E1224fs	Frameshift deletion	Truncada
2745	PKD_CHUP290	PKD1	c.3671_3675del	p.E1224fs	Frameshift deletion	Truncada
2825	PKD_CHUP318	PKD1	c.12445C>T	p.R4149C	Nonsynonymous SNV	No truncada
2823	PKD_CHUP318	PKD1	c.12445C>T	p.R4149C	Nonsynonymous SNV	No truncada
2867	PKD_CHUP343	PKD1	c.2878G>A	p.G960S	Nonsynonymous SNV	No truncada
2870	PKD_CHUP344	PKD1	c.12691C>T	p.Q4231X	Stopgain	Truncada
2869	PKD_CHUP344	PKD1	c.12691C>T	p.Q4231X	Stopgain	Truncada
2872	PKD_CHUP345	PKD1	c.9584G>C	p.W3195S	Nonsynonymous SNV	No truncada
2873	PKD_CHUP345	PKD1	c.9584G>C	p.W3195S	Nonsynonymous SNV	No truncada
2868	PKD_CHUP358	PKD2	c.2152dupA	p.L717fs	Frameshift insertion	Truncada
3441	PKD_CHUP358	PKD2	c.2152dupA	p.L717fs	Frameshift insertion	Truncada
2949	PKD_CHUP377	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
2958	PKD_CHUP377	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
2950	PKD_CHUP378	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
2951	PKD_CHUP378	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
2959	PKD_CHUP378	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
3047	PKD_CHUP378	PKD1	c.10303C>T	p.Q3435X	Stopgain	Truncada
2954	PKD_CHUP380	PKD1	c.11780G>A	p.W3927X	Stopgain	Truncada
2961	PKD_CHUP382	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
2960	PKD_CHUP382	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
3437	PKD_CHUP382	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
3024	PKD_CHUP403	PKD2	c.950G>A	p.G317E	Nonsynonymous SNV	No truncada
3029	PKD_CHUP407	PKD1	c.9074G>A	p.W3025X	Stopgain	Truncada
3032	PKD_CHUP409	PKD1	c.6026_6029del	p.S2009fs	Frameshift deletion	Truncada
3049	PKD_CHUP412	PKD1	c.12031C>T	p.Q4011X	Stopgain	Truncada
3041	PKD_CHUP412	PKD1	c.12031C>T	p.Q4011X	Stopgain	Truncada
3042	PKD_CHUP412	PKD1	c.12031C>T	p.Q4011X	Stopgain	Truncada
3453	PKD_CHUP412	PKD1	c.12031C>T	p.Q4011X	Stopgain	Truncada
3534	PKD_CHUP412	PKD1	c.12031C>T	p.Q4011X	Stopgain	Truncada
3043	PKD_CHUP413	PKD1	c.2685dupA	p.V896fs	Frameshift insertion	Truncada
3044	PKD_CHUP413	PKD1	c.2685dupA	p.V896fs	Frameshift insertion	Truncada
3048	PKD_CHUP415	PKD1	c.6197T>G	p.L2066R	Nonsynonymous SNV	No truncada
3052	PKD_CHUP416	PKD2	c.2533C>T	p.R845X	Stopgain	Truncada
3059	PKD_CHUP438	PKD1	c.12082dupG	p.V4028fs	Frameshift insertion	Truncada
3060	PKD_CHUP439	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
3110	PKD_CHUP457	PKD1	c.10312C>T	p.R3438W	Nonsynonymous SNV	No truncada
3110	PKD_CHUP457	PKD1	c.9829C>T	p.R3277C	Nonsynonymous SNV	No truncada

Complejo Hospitalario de Pontevedra (CHOP) continuación.

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
3114	PKD_CHUP458	PKD1	c.6360C>A	p.Y2120X	Stopgain	Truncada
3545	PKD_CHUP498	PKD1	c.6778_6780del	p.2260_2260del	Nonframeshift deletion	No truncada
3275	PKD_CHUP518	PKD1	c.3165G>A	p.W1055X	Stopgain	Truncada
3293	PKD_CHUP520	PKD1	c.7547G>A	p.R2516H	Nonsynonymous SNV	No truncada
3370	PKD_CHUP540	PKD2	c.1094+1->TT		Splicing	Truncada
3460	PKD_CHUP571	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
3556	PKD_CHUP596	PKD1	c.825delC	p.A275fs	Frameshift deletion	Truncada
3535	PKD_CHUP597	PKD1	c.131dupG	p.G44fs	Frameshift insertion	Truncada
3564	PKD_CHUP602	PKD1	c.2878G>A	p.G960S	Nonsynonymous SNV	No truncada
3565	PKD_CHUP602	PKD1	c.2878G>A	p.G960S	Nonsynonymous SNV	No truncada
3568	PKD_CHUP603	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncada
2865	PKD_CHUS17	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncada
39	PKD_CHUS17	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncada
653	PKD_CHUS102	PKD1		p.G16fs	Frameshift insertion	Truncada
2947	PKD_CHUS102	PKD1		p.G16fs	Frameshift insertion	Truncada
2957	PKD_CHUS102	PKD1		p.G16fs	Frameshift insertion	Truncada
3037	PKD_CHUS102	PKD1		p.G16fs	Frameshift insertion	Truncada
285	PKD_CHUS24_57	PKD2	c.2533C>T	p.R845X	Stopgain	Truncada
222	PKD_CHUS39	PKD1	c.7915C>T	p.R2639X	Stopgain	Truncada
15	PKD_CHUS5_209	PKD1	c.5014delA	p.R1672fs	Frameshift deletion	Truncada

Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUOU)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2846	PKD_CHOU333	PKD1	c.1782delT	p.F594fs	Frameshift deletion	Truncada
2849	PKD_CHOU336	PKD2	c.1081C>T	p.R361X	Stopgain	Truncada
3425	PKD_CHUAC352	PKD1	c.7036G>A	p.G2346S	Nonsynonymous SNV	No truncada
2701	PKD_CHUOU281	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
2699	PKD_CHUOU283	PKD2	c.2508C>A	p.Y836X	Stopgain	Truncada
2696	PKD_CHUOU284	PKD1	c.6397_6399del	p.2133_2133del	Nonframeshift deletion	No truncada
2705	PKD_CHUOU285	PKD1	c.5515T>C	p.W1839R	Nonsynonymous SNV	No truncada
2793	PKD_CHUOU285	PKD1	c.5515T>C	p.W1839R	Nonsynonymous SNV	No truncada
2708	PKD_CHUOU286	PKD1	c.3706C>T	p.Q1236X	Stopgain	Truncada
2792	PKD_CHUOU286	PKD1	c.3706C>T	p.Q1236X	Stopgain	Truncada
2709	PKD_CHUOU287	PKD2	c.839G>A	p.W280X	Stopgain	Truncada
3207	PKD_CHUOU287	PKD2	c.839G>A	p.W280X	Stopgain	Truncada
3335	PKD_CHUOU287	PKD2	c.839G>A	p.W280X	Stopgain	Truncada
2710	PKD_CHUOU288	PKD1	c.9539G>A	p.W3180X	Stopgain	Truncada
3473	PKD_CHUOU288	PKD1	c.9539G>A	p.W3180X	Stopgain	Truncada
2787	PKD_CHUOU311	PKD2	c.1081C>T	p.R361X	Stopgain	Truncada
2791	PKD_CHUOU311	PKD2	c.1081C>T	p.R361X	Stopgain	Truncada
2993	PKD_CHUOU311	PKD2	c.1081C>T	p.R361X	Stopgain	Truncada
2789	PKD_CHUOU313	PKHD1	c.1180G>A	p.A394T	Nonsynonymous SNV	No truncada
		PKHD1	c.8345G>C	p.G2782A	Nonsynonymous SNV	No truncada
2790	PKD_CHUOU313	PKHD1	c.1180G>A	p.A394T	Nonsynonymous SNV	No truncada
		PKHD1	c.8345G>C	p.G2782A	Nonsynonymous SNV	No truncada
2845	PKD_CHUOU332	PKD1	c.11713-2A>G		Splicing	Truncada
2848	PKD_CHUOU335	PKD2	c.1695_1696del	p.T565fs	Frameshift deletion	Truncada
2998	PKD_CHUOU392	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada
2999	PKD_CHUOU392	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada
3474	PKD_CHUOU392	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada
3477	PKD_CHUOU392	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada
3000	PKD_CHUOU393	PKD1	c.5995G>A	p.G1999S	Nonsynonymous SNV	No truncada
3001	PKD_CHUOU394	PKD1	c.9339delG	p.G3113fs	Frameshift deletion	Truncada
3002	PKD_CHUOU395	PKD1	c.10348G>A	p.D3450N	Nonsynonymous SNV	No truncada
3004	PKD_CHUOU397	PKD1	c.6789delC	p.G2263fs	Frameshift deletion	Truncada
3101	PKD_CHUOU446	HNF1B	c.540_544del	p.L180fs	Frameshift deletion	Truncada
		TSC2	c.1387A>G	p.I463V	Nonsynonymous SNV	No truncada
3206	PKD_CHUOU494	PKD1	c.4177C>T	p.Q1393X	Stopgain	Truncada
		PKD1	c.4621A>T	p.N1541Y	Nonsynonymous SNV	No truncada
3211	PKD_CHUOU494	PKD1	c.4177C>T	p.Q1393X	Stopgain	Truncada
		PKD1	c.4621A>T	p.N1541Y	Nonsynonymous SNV	No truncada
3424	PKD_CHUOU565	PKD1	c.4313delC	p.P1438fs	Frameshift deletion	Truncada
3520	PKD_CHUOU574	PKD2	c.973C>T	p.R325X	Stopgain	Truncada
3472	PKD_CHUOU574	PKD2	c.973C>T	p.R325X	Stopgain	Truncada
3522	PKD_CHUOU575	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada
3475	PKD_CHUOU575	PKD1	c.4529delG	p.G1510fs	Frameshift deletion	Truncada

Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUOU)
continuación

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
3521	PKD_CHUOUS90	PKD1	c.12048G>C	p.K4016N	Nonsynonymous SNV	No truncada
2698	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
1293	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
1294	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
2702	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
2706	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
2707	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
2794	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
3576	PKD_CHUS192	PKD1	c.6031C>T	p.Q2011X	Stopgain	Truncada
1413	PKD_CHUS204	PKD1	c.7138G>T	p.E2380X	Stopgain	Truncada
		PKD1	c.8125C>T	p.P2709S	Nonsynonymous SNV	No truncada
1414	PKD_CHUS204	PKD1	c.7138G>T	p.E2380X	Stopgain	Truncada
		PKD1	c.8125C>T	p.P2709S	Nonsynonymous SNV	No truncada
2997	PKD_CHUS31	PKD2	c.1094+3_6delAAGT	p.Ala365fs	Frameshift deletion	Truncada
3337	PKD_CHUS31	PKD2	c.1094+3_6delAAGT	p.Ala365fs	Frameshift deletion	Truncada
3476	PKD_CHUVI450	PKD1	c.7489+2T>G		Splicing	Truncada

Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2751	PKD_CHUP431	PKD1	c.4951C>T	p.Q1651X	Stopgain	Truncante
3224	PKD_CHUS10	PKD1	c.11783G>A	p.W3928X	Stopgain	Truncante
1362	PKD_CHUS18	PKD1	c.8522G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
3598	PKD_CHUS201	PKD1	c.8284_8295del	p.2762_2765del	Nonframeshift deletion	No truncante
1396	PKD_CHUS202	PKD1	c.4517C>T	p.R1436X	Stopgain	Truncante
1525	PKD_CHUS210	PKD1	c.7531G>C	p.A2511P	Nonsynonymous SNV	No truncante
85	PKD_CHUS22	PKD1	c.2853+1G>-		Splicing	Truncante
2939	PKD_CHUVI374	PKD1	c.9792delC	p.L3264fs	Frameshift deletion	Truncante
2942	PKD_CHUVI374	PKD1	c.9792delC	p.L3264fs	Frameshift deletion	Truncante
3155	PKD_CHUVI465	PKD1	c.6796C>T	p.R2266C	Nonsynonymous SNV	No truncante
3171	PKD_CHUVI471	PKD1	c.4306C>T	p.R1436X	Stopgain	Truncante
3197	PKD_CHUVI490	PKD1	c.10318C>T	p.Q3440X	Stopgain	Truncante
3199	PKD_CHUVI491	PKD1	c.12061C>T	p.R4021X	Stopgain	Truncante
3307	PKD_CHUVI524	PKD1	c.694T>C	p.C232R	Nonsynonymous SNV	No truncante
3392	PKD_CHUVI554	PKD1	c.386G>T	p.C129F	Nonsynonymous SNV	No truncante
3502	PKD_CHUVI582	PKD2	c.964C>G	p.R322G	Nonsynonymous SNV	No truncante
3503	PKD_CHUVI583	PKD1	c.2393T>A	p.V798D	Nonsynonymous SNV	No truncante
3518	PKD_CHUVI589	PKD1	c.578delC	p.A193fs	Frameshift deletion	Truncante
3519	PKD_CHUVI589	PKD1	c.578delC	p.A193fs	Frameshift deletion	Truncante
2667	PKD_CHUVI591	PKD1	c.11343_11344insCGAC	p.V3782fs	Frameshift insertion	Truncante
3524	PKD_CHUVI593	PKD1	c.4957C>T	p.Q1653X	Stopgain	Truncante
3527	PKD_CHUVI595	PKD1	c.4957C>T	p.C210Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
3599	PKD_CHUVI617	PKD1	c.8284_8295del	p.2762_2765del	Nonframeshift deletion	No truncante

Hospital de Povisa

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
2784	PKD_CHUS110	PKD1	c.7003delG	p.E2335fs	Frameshift deletion	Truncante
1493	PKD_CHUS201	PKD1	c.8284_8295del	p.2762_2765del	Nonframeshift deletion	No truncante
2786	PKD_CHUS44	PKD1	c.108_109insC	p.C37fs	Frameshift deletion	Truncante
2940	PKD_CHUVI374	PKD1	c.9792delC	p.L3264fs	Frameshift deletion	Truncante
2941	PKD_CHUVI374	PKD1	c.9792delC	p.L3264fs	Frameshift deletion	Truncante
2926	PKD_POV275	RP1	c.1118C>T	p.T373I	Nonsynonymous SNV	No truncante
2777	PKD_POV303	PKD1	c.1591G>A	p.L922P	Nonsynonymous SNV	No truncante
2490	PKD_POV305	PKD1	c.1591G>A	p.E531K	Nonsynonymous SNV	No truncante
2781	PKD_POV307	PKD1	c.1591G>A	p.E531K	Nonsynonymous SNV	No truncante
2785	PKD_POV310	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncante
2315	PKD_POV419	PKD1	c.4951C>T	p.Q1651X	Stopgain	Truncante
2717	PKD_POV420	PKD1	c.11253dupG	p.R3752fs	Frameshift insertion	Truncante
2718	PKD_POV421	PKD1	c.9829C>T	p.R3277C	Nonsynonymous SNV	No truncante
2719	PKD_POV422	PKD1	c.9829C>T	p.L922P	Nonsynonymous SNV	No truncante
2721	PKD_POV428	PKHD1	c.5485C>T	p.Q1829X	Stopgain	Truncante
		PKHD1	c.9719G>A	p.R3240Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
3594	PKD_POV616	PKD1	c.5367delA	p.S1789fs	Frameshift deletion	Truncante

Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
3286	PKD_CHUF338	GANAB	c.914C>A	p.P305Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
2918	PKD_CHUF369	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2731	PKD_CHUF447	PKD1	c.8447T>A	p.L2816Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
3119	PKD_CHUF460	PKD1	c.11534G>C	p.R3845T	Nonsynonymous SNV	No truncante
3216	PKD_CHUF496	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncante
3511	PKD_CHUF496	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncante
3260	PKD_CHUF514	PKD1	c.10438_10439insGG	p.V3480fs	Frameshift insertion	Truncante
3301	PKD_CHUF521	PKD2	c.2047_2050del	p.D682fs	Frameshift deletion	Truncante
3345	PKD_CHUF535	PKD1	c.12305delC	p.A4102fs	Frameshift deletion	Truncante
3512	PKD_CHUF587	PKD2	c.2019+1G>A		Splicing	Truncante

Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2875	PKD_CHUAC346	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2878	PKD_CHUAC349	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2879	PKD_CHUAC350	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
2880	PKD_CHUAC351	PKD1	c.11064T>G	p.Y3688X	Stopgain	Truncante
2885	PKD_CHUAC353	PKD2	c.242delC	p.S81fs	Frameshift deletion	Truncante
3375	PKD_CHUAC353	PKD2	c.242delC	p.S81fs	Frameshift deletion	Truncante
2891	PKD_CHUAC356	PKD1	c.8991C>G	p.S2997R	Nonsynonymous SNV	No truncante
2896	PKD_CHUAC359	PKD1	c.8451delC	p.A2817fs	Frameshift deletion	Truncante
		GANAB	c.2258A>G	p.H753R	Nonsynonymous SNV	No truncante
2898	PKD_CHUAC361	PKD1	c.11772delA	p.E3924fs	Frameshift deletion	Truncante
2900	PKD_CHUAC362	PKD1	c.8275C>T	p.L2759F	Nonsynonymous SNV	No truncante
2901	PKD_CHUAC363	PKD1	c.11927T>G	p.F3976C	Nonsynonymous SNV	No truncante
2902	PKD_CHUAC364	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
2907	PKD_CHUAC367	PKD1	c.7252G>T	p.D2418Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
3178	PKD_CHUAC476	PKD1	c.8293C>T	p.R2765C	Nonsynonymous SNV	No truncante
3183	PKD_CHUAC480	PKD1	c.7861G>C	p.E2621Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
3185	PKD_CHUAC482	PKD2	c.2533C>T	p.R845X	Stopgain	Truncante
3186	PKD_CHUAC483	PKD1	c.11398delG	p.D3800fs	Frameshift deletion	Truncante
3187	PKD_CHUAC484	PKD1	c.6100G>A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
3188	PKD_CHUAC485	PKD2	c.2119-2A>G		Splicing	Truncante
3189	PKD_CHUAC486	PKD2	c.1319+1G>A		Splicing	Truncante
3191	PKD_CHUAC488	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3228	PKD_CHUAC499	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3229	PKD_CHUAC500	PKD1	c.7223G>C	p.R2408P	Nonsynonymous SNV	No truncante
3230	PKD_CHUAC501	PKD1	c.12682C>T	p.R4228X	Stopgain	Truncante
3231	PKD_CHUAC502	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncante
3232	PKD_CHUAC503	PKD2		c.595+1G>C	Splicing	Truncante
3234	PKD_CHUAC505	PKD1		c.10051-2A>G	Splicing	Truncante
3235	PKD_CHUAC506	PKD1	c.6100G>A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
3240	PKD_CHUAC508	PKD1	c.6643C>T	p.R2215W	Nonsynonymous SNV	No truncante
3241	PKD_CHUAC509	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3242	PKD_CHUAC510	PKD2	c.1753C>T	p.Q585X	Stopgain	Truncante
3242	PKD_CHUAC511	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3244	PKD_CHUAC512	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncante
3372	PKD_CHUAC542	PKD1	c.165_171del	p.G55fs	Frameshift deletion	Truncante
3373	PKD_CHUAC543	PKD1	c.7252G>T	p.D2418Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
3374	PKD_CHUAC544	PKD1	c.6483dupG	p.R2162fs	Frameshift insertion	Truncante
3383	PKD_CHUAC549	PKD1	c.11780G>A	p.W3927X	Stopgain	Truncante
3386	PKD_CHUAC549	PKD1	c.11780G>A	p.W3927X	Stopgain	Truncante
3384	PKD_CHUAC550	PKD1	c.2393T>A	p.V798D	Nonsynonymous SNV	No truncante
3385	PKD_CHUAC551	PKD1	c.288-2A>G		Splicing	Truncante
3387	PKD_CHUAC552	PKD1	c.5552_5553del	p.H1851fs	Frameshift deletion	Truncante

Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)
continuación

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2874	PKD_CHUAC562	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
3581	PKD_CHUAC606	PKD1	c.4196G>A	p.W1399X	Stopgain	Truncante
3582	PKD_CHUAC607	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3587	PKD_CHUAC609	PKD1	c.3058C>T	p.Q1020X	Stopgain	Truncante
3588	PKD_CHUAC610	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
3589	PKD_CHUAC611	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3590	PKD_CHUAC612	PKD1	c.5989C>T	p.Q1997X	Stopgain	Truncante
3591	PKD_CHUAC613	PKD1	c.9409C>T	p.H3137Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
2852	PKD_CHUOU332	PKD1	c.11713-2A>G		Splicing	Truncante
3179	PKD_CHUS10	PKD1	c.11783G>A	p.W3928X	Stopgain	Truncante
3064	PKD_CHUS100	PKD1	c.3428_3429ins4	p.P1143fsX	Frameshift insertion	Truncante
3580	PKD_CHUS193	PKD1	c.5968_5969del	p.V896fs	Frameshift deletion	Truncante
1404	PKD_CHUS203	PKD1	c.2685dupA	p.V896fs	Frameshift deletion	Truncante
1663	PKD_CHUS221	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
2889	PKD_CHUS355	PKD2	c.1753C>T	p.Q585X	Stopgain	Truncante
3583	PKD_CHUS47	PKD2	c.1726dupT	p.K575fs	Frameshift insertion	Truncante
2899	PKD_CHUS73	PKD1	c.11780G>A	p.W3927X	Stopgain	Truncante
1358	PKD_CHUS95	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
3312	PKD_HULA452	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
3313	PKD_HULA452	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
3378	PKD_CHUS302	PKD1	c.2534T>A	p.L845X	Stopgain	Truncante

Hospital de Burela

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
3586	PKD_BUR271	PKD1	c.3745delG	p.D1249fs	Frameshift deletion	Truncante
3220	PKD_BUR328	PKD1	c.3213C>G	p.Y1071X	Stopgain	Truncante
3546	PKD_BUR328	PKD1	c.3213C>G	p.Y1071X	Stopgain	Truncante
3368	PKD_BUR329	PKD2	c.950G>A	p.G317E	Nonsynonymous SNV	No truncante
3369	PKD_BUR329	PKD2	c.950G>A	p.G317E	Nonsynonymous SNV	No truncante
2652	PKD_BUR404	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
2668	PKD_BUR417	PKD1	c.1591G>A	p.E531K	Nonsynonymous SNV	No truncante
2618	PKD_BUR426	PKD2	c.1320_1368del	p.R440fs	Frameshift deletion	Truncante
3239	PKD_BUR426	PKD2	c.1320_1368del	p.R440fs	Frameshift deletion	Truncante
2674	PKD_BUR427	PKD1	c.5875delG	p.A1959fs	Frameshift deletion	Truncante
3092	PKD_BUR455	PKD1	c.11338T>G	p.Y3780D	Nonsynonymous SNV	No truncante
3126	PKD_BUR462	PKD1	c.3955G>A	p.G1319R	Nonsynonymous SNV	No truncante
3134	PKD_BUR463	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
3160	PKD_BUR468	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
3192	PKD_BUR489	PKD2	c.1548+1G>A		Splicing	Truncante
3219	PKD_BUR489	PKD2	c.1548+1G>A		Splicing	Truncante
3223	PKD_BUR497	PKD1	c.11941C>T	p.Q3981X	Stopgain	Truncante
3222	PKD_BUR497	PKD1	c.11941C>T	p.Q3981X	Stopgain	Truncante
3238	PKD_BUR507	PKD1	c.G1663T	p.G555X	Stopgain	Truncante
3259	PKD_BUR507	PKD1	c.G1663T	p.G555X	Stopgain	Truncante
3451	PKD_BUR507	PKD1	c.G1663T	p.G555X	Stopgain	Truncante
3510	PKD_BUR586	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
3558	PKD_BUR600	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift insertion	Truncante
3584	PKD_CHUAC608	GANAB	c.2512G>A	p.V838M	Nonsynonymous SNV	No truncante

Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
3040	PKD_CHUS186	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
		PKD1	c.6899G>T	p.C2300F	Nonsynonymous SNV	No truncante
2808	PKD_HULA316	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
3008	PKD_HULA316	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
2832	PKD_HULA331	PKD2	c.965G>A	p.R322Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
2928	PKD_HULA370	PKD1	c.12138+5G>A		Splicing	Truncante
2936	PKD_HULA372	PKD1	c.10110_10128del	p.C3370fs	Frameshift deletion	Truncante
2937	PKD_HULA373	PKD2	c.1695_1696del	p.T565fs	Frameshift deletion	Truncante
2953	PKD_HULA379	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift inserion	Truncante
2983	PKD_HULA387	PKD2	c.1753C>T	p.Q585X	Stopgain	Truncante
3016	PKD_HULA402	PKD1	c.3673C>T	p.Q1225X	Stopgain	Truncante
3033	PKD_HULA410	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift inserion	Truncante
3050	PKD_HULA414	PKD2	c.2774dupT	p.I925fs	Frameshift inserion	Truncante
2753	PKD_HULA432	PKD1	c.5105_5106insAT	p.M1702fs	Frameshift inserion	Truncante
		PKD1	c.12823C>T	p.R4275W	Nonsynonymous SNV	No truncante
3055	PKD_HULA434	PKD1	c.9592C>T	p.Q3198X	Stopgain	Truncante
3067	PKD_HULA440	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift inserion	Truncante
3071	PKD_HULA442	PKD2	c.1783dupA	p.A594fs	Frameshift inserion	Truncante
3073	PKD_HULA443	PKD1	c.8017-3C>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.12823C>T	p.R4275W	Nonsynonymous SNV	No truncante
3086	PKD_HULA452	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
3311	PKD_HULA527	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante
3318	PKD_HULA528	PKD1	c.10832C>A	p.A3611D	Nonsynonymous SNV	No truncante
3393	PKD_HULA555	PKD1	c.7066_7069del	p.V2356fs	Frameshift deletion	Truncante
3414	PKD_HULA561	PKD1	c.4713delG	p.S1571fs	Frameshift deletion	Truncante
3498	PKD_HULA581	PKD2	c.181C>T	p.Q61X	Stopgain	Truncante
3504	PKD_HULA584	PKD2	c.2358+1G>T		Splicing	Truncante

Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS)

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
8	PKD_CHUS1	PKD1		p.L1697fs	Frameshift deletion	Truncante
99	PKD_CHUS10	PKD1	c.11783G>A	p.W3928X	Stopgain	Truncante
3391	PKD_CHUS10	PKD1	c.11783G>A	p.W3928X	Stopgain	Truncante
860	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
1694	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
2644	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3236	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3283	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3403	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3404	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3452	PKD_CHUS103	PKD2	c.1094+2T>G		Splicing	Truncante
		PKD1	c.9034A>G	p.T3012A	Nonsynonymous SNV	No truncante
48	PKD_CHUS12	PKD2	c.1960C>T	p.R654X	Stopgain	Truncante
51	PKD_CHUS12	PKD2	c.1960C>T	p.R654X	Stopgain	Truncante
3416	PKD_CHUS121	PKD1	c.6100G>A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
1750	PKD_CHUS148_191	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
63	PKD_CHUS16	PKD1	c.8471A>G	p.Q2824R	Nonsynonymous SNV	No truncante
1316	PKD_CHUS195	PKD1	c.8302G>A	p.V2768M	Nonsynonymous SNV	No truncante
			c.7723C>G	p.P2575A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3063	PKD_CHUS195	PKD1	c.8302G>A	p.V2768M	Nonsynonymous SNV	No truncante
			c.7723C>G	p.P2575A	Nonsynonymous SNV	No truncante
1419	PKD_CHUS198	PKD1	c.10756dupG	p.A3586fs	Frameshift insertion	Truncante
742	PKD_CHUS20	PKD1		p.S2009fs	Frameshift insertion	Truncante
1458	PKD_CHUS207	PKD1	c.10317_10327del	p.G3439fs	Frameshift deletion	Truncante
1647	PKD_CHUS218	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
1693	PKD_CHUS222	PKD1	c.7252G>T	p.D2418Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
1726	PKD_CHUS224	PKD2	c.1481delA	p.E494fs	Frameshift deletion	Truncante
1681	PKD_CHUS224	PKD2	c.1481delA	p.E494fs	Frameshift deletion	Truncante
599	PKD_CHUS23	PKD1	c.12007C>T	p.Q4003X	Stopgain	Truncante
1299	PKD_CHUS24_57	PKD2	c.2533C>T	p.R845X	Stopgain	Truncante
1858	PKD_CHUS242	PKD1	c.2180T>C	p.L727P	Nonsynonymous SNV	No truncante
1994	PKD_CHUS251	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
1992	PKD_CHUS251	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
96	PKD_CHUS26	PKD1	c.12445C>T	p.R4149C	Nonsynonymous SNV	No truncante
2653	PKD_CHUS273	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2800	PKD_CHUS273	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2801	PKD_CHUS273	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2818	PKD_CHUS273	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
2829	PKD_CHUS292	PKD2	c.1301A>G	p.N434S	Nonsynonymous SNV	No truncante
2828	PKD_CHUS292	PKD2	c.1301A>G	p.N434S	Nonsynonymous SNV	No truncante
3078	PKD_CHUS292	PKD2	c.1301A>G	p.N434S	Nonsynonymous SNV	No truncante
2930	PKD_CHUS296	PKD1	c.6346A>T	p.R2116W	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD1	c.5179C>G	p.P1727A	Nonsynonymous SNV	No truncante
3405	PKD_CHUS301	PKD1	c.5927T>A	p.V1976E	Nonsynonymous SNV	No truncante

ID	Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto de la proteína
2730	PKD_CHUS339	PKD1	c.7061A>C	p.Q2354P	Nonsynonymous SNV	No truncante
2863	PKD_CHUS341	PKD1	c.9829C>T	p.R3277C	Nonsynonymous SNV	No truncante
3268	PKD_CHUS35	PKD1	c.12679C>T	p.R4227X	Nonsynonymous SNV	No truncante
216	PKD_CHUS35	PKD1	c.12679C>T	p.R4227X	Stopgain	Truncante
3484	PKD_CHUS37	PKD2	c.916C>T	p.R306X	Stopgain	Truncante
3485	PKD_CHUS37	PKD2	c.916C>T	p.R306X	Stopgain	Truncante
165	PKD_CHUS40	PKD1	c.2097+1G>T		Splicing	Truncante
166	PKD_CHUS40	PKD1	c.2097+1G>T		Splicing	Truncante
459	PKD_CHUS41	PKD1	c.G6100A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
1790	PKD_CHUS41	PKD1	c.G6100A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD2	c.T1604C	p.L535P	Nonsynonymous SNV	No truncante
2888	PKD_CHUS41	PKD1	c.G6100A	p.G2034R	Nonsynonymous SNV	No truncante
2743	PKD_CHUS429	PKD2	c.2411G>A	p.S804N	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD1	c.4810G>A	p.V1604M	Nonsynonymous SNV	No truncante
3077	PKD_CHUS444	PKD2	c.181C>T	p.Q61X	Stopgain	Truncante
441	PKD_CHUS46	PKD1	c.2685dupA	p.V896fs	Frameshift insertion	Truncante
3325	PKD_CHUS46	PKD1	c.2685dupA	p.V896fs	Frameshift insertion	Truncante
3181	PKD_CHUS478	PKD1	c.9201+5G>C		Splicing	Truncante
3305	PKD_CHUS523	PKD2	c.2152dupA	p.L717fs	Frameshift insertion	Truncante
3304	PKD_CHUS523	PKD2	c.2152dupA	p.L717fs	Frameshift insertion	Truncante
3321	PKD_CHUS529	PKD1	c.95C>A	p.P32H	Nonsynonymous SNV	No truncante
481	PKD_CHUS53	PKD1	c.3043delC	p.R1015fs	Frameshift deletion	Truncante
257	PKD_CHUS53	PKD1	c.3043delC	p.R1015fs	Frameshift deletion	Truncante
3358	PKD_CHUS536	GANAB	c.1715A>T	p.H572L	Nonsynonymous SNV	No truncante
3359	PKD_CHUS536	GANAB	c.1715A>T	p.H572L	Nonsynonymous SNV	No truncante
3367	PKD_CHUS539	PKD2	c.181C>T	p.Q61X	Stopgain	Truncante
321	PKD_CHUS58	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
322	PKD_CHUS58	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
464	PKD_CHUS58	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
395	PKD_CHUS59	PKD1	c.10947insC	p.F3579fs	Frameshift insertion	Truncante
3523	PKD_CHUS592	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
75	PKD_CHUS6	PKD1	c.9202G>C	p.E3068Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD1	c.4103C>T	p.A1368V	Nonsynonymous SNV	No truncante
205	PKD_CHUS6	PKD1	c.9202G>C	p.E3068Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD1	c.4103C>T	p.A1368V	Nonsynonymous SNV	No truncante
3364	PKD_CHUS6	PKD1	c.9202G>C	p.E3068Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
		PKD1	c.4103C>T	p.A1368V	Nonsynonymous SNV	No truncante
56	PKD_CHUS7	PKD1		p.Y680fsx	Frameshift insertion	Truncante
145	PKD_CHUS70	PKD1	c.T5213G	p.L1738R	Nonsynonymous SNV	No truncante
3338	PKD_CHUS70	PKD1	c.T5213G	p.L1738R	Nonsynonymous SNV	No truncante
1661	PKD_CHUS74	PKD1	c.2684_2685delCA	p.S895fs	Frameshift deletion	Truncante
160	PKD_CHUS8	PKD1	c.2298_2308del	p.A766fs	Frameshift deletion	Truncante
356	PKD_CHUS8	PKD1	c.2298_2308del	p.A766fs	Frameshift deletion	Truncante
1583	PKD_CHUS87	PKD1	c.856_862delTCTGGCC	p.S286fs	Frameshift deletion	Truncante
3270	PKD_CHUS9_56	PKD2	c.1532A>T	p.D511V	Nonsynonymous SNV	No truncante
3322	PKD_CHUS9_56	PKD2	c.1532A>T	p.D511V	Nonsynonymous SNV	No truncante
3389	PKD_CHUS9_56	PKD2	c.1532A>T	p.D511V	Nonsynonymous SNV	No truncante
3390	PKD_CHUS9_56	PKD2	c.1532A>T	p.D511V	Nonsynonymous SNV	No truncante
3265	PKD_CHUS92	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
540	PKD_CHUS93	PKD1	c.2152C>T	p.Q718X	Stopgain	Truncante

NOTA: En negrita se indican los casos índice de la familia a los que se les realizó el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*



ANEXO 5

Variantes identificadas en las familias del registro histórico NefroCHUS.

Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
PKD_CHUS2	PKD1		p.G55fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS3	PKD1	c.1781T>C	p.F594S	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS4	PKD2	c.916C>T	p.R306X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS11	PKD1	c.9395C>T	p.S3132L	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS15	TCTN2	c.1154A>G	p.Y385C	Nonsynonymous SNV	No truncante
	BBS4	c.439T>A	p.Y147N	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS21	PKD1	c.2285G>A	p.W762X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS28	PKD1	c.12448C>T	p.R4150C	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS30	PKD1	c.696T>A	p.C232X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS38	PKD1	c.3067C>T	p.Q1023X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS42	PKD2	c.916C>T	p.R306X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS48	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS49	PKD1	c.8385C>G	p.C2795W	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS51	PKD1	c.7007A>C	p.Y2336S	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS55	PKD1	c.9202G>C	p.E3068Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS60	PKD1	c.7292T>A	p.L2431Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS61	PKD1	c.6727_6728del	p.Q2243fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS63	PKD2	c.2509G>T	p.E837X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS65	PKD1	c.9509C>T	p.Q3100X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS68	PKD1	c.4822A>C	p.N1608H	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS72	PKD1	c.1660C>T	p.Q554X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS77	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
PKD_CHUS78	PKD1		p.R2359fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS79	PKD1	c.4822A>C	p.N1608H	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS80	PKD1	c.216-10 G>T		Splicing	Truncante
PKD_CHUS81	PKD1	c.7225 delC	p.F2338fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS82	PKD1	c.9145_9146 delTTC	p.T3049del	Nonframeshift deletion	No truncante
PKD_CHUS85	PKD1	c.10003delC	p.L3264 fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS86	PKD1	c.6152G>A	p.R2051H	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS88	PKD2	c.1443 delT	p.P481fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS91	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS97	PKD1	c.2097+1G>A		Splicing	Truncante
PKD_CHUS98	PKD1	c.1660C>T	p.Q554X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS99	PKD1	c.1660C>T	p.Q554X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS107	PKD1	c.9185T>C	p.V3062A	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS108	PKD1	c.9395C>T	p.S3132L	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS111	PKD1		p.H3199fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS114	PKD1	c.7861G>T	p.E2621X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS117	PKD1	c.10110del18pb	p.A3371del	Nonframeshift deletion	No truncante
PKD_CHUS119	PKD1	c.8311G>A	p.E2771K	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS142	PKD1	c.11184delAAG	p.E3659del	Nonframeshift deletion	No truncante
PKD_CHUS145	PKD1	c.6487C>T	p.R2163X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS158	PKD2	c.1255A>G	p.T419A	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS184	PKD1	c.10103A>C	p.D3368A	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS197	PKD1	c.8825 delA	p.I2872fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS206	PKD1		p.R3438fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUS244	PKD2	c.2419C>T	p.R807X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS246	PKD1	c.12577C>T	p.Q4193X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUS250	PKD2	c.1301A>G	p.N434S	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS256	TSC2	c.975+1->T		Splicing	Truncante
PKD_CHUS257	PKD1	c.1211C>G	p.P404R	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CEE259	PKD1	c.10710_10715del	p.3570_3572del	Nonframeshift deletion	No truncante

MARÍA LARA BESADA CERECEDO

Familia	Gen	c.DNA	Proteína	Clasificación	Efecto en la proteína
PKD_BUR261	PKD1	c.2155C>T	p.H719Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUAC262	PKD1	c.9409C>T	p.H3137Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUAC263	PKD2	c.1081C>T	p.R361X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUAC264	PKD1	c.8925dupC	p.Y2976fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUP265	PKD1	c.6488G>A	p.R2163Q	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_HULA267	UMOD	c.863G>A	p.C288Y	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_BUR268	PKD1	c.6749C>T	p.T2250M	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUF270	TSC2	c.4589C>T	p.S1530L	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS272	PKD1	c.8137G>T	p.G2713X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUOU277	HNF1B	c.544C>T	p.Q182X	Stopgain	Truncante
PKD_CHUAC295	PKD2	c.595+1G>C		Splicing	Truncante
PKD_CHUP321	PKD1	c.8497C>T	p.P2833S	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUP322	PKD1	c.578delC	p.A193fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUVI323	PKHD1	c.9689delA	p.D3230fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_HULA325	UMOD	c.1046A>C	p.Q349P	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_HULA326	PKHD1	c.3503C>T	p.P1168L	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUVI337	INVS	c.833A>G	p.N278S	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUOU445	PKD1	c.7241C>T	p.T2414M	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUS461	PKD1	c.7307G>T	p.G2436V	Nonsynonymous SNV	No truncante
PKD_CHUF526	PKD1	c.2187_2209del	p.C729fs	Frameshift ins/del	Truncante
PKD_CHUP556	DNAI1	c.910C>G	p.Q304E	Nonsynonymous SNV	No truncante



Índice Tablas

Tabla 1.	Características de los diseños HaloPlex utilizados en este trabajo.....	65
Tabla 2.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la amplificación de la región replicada del gen <i>PKD1</i> mediante 8 PCR LR.....	69
Tabla 3.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la PCR LR T1.....	70
Tabla 4.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la PCR LR T2-T7 y T8-T2.....	71
Tabla 5.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la PCR LR T2-T7 y T8-T2.....	71
Tabla 6.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T29-T34.....	72
Tabla 7.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T22.....	73
Tabla 8.	Condiciones para la amplificación de las PCR-LR.....	73
Tabla 9.	Tamaño de los amplicones.....	74
Tabla 10.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la amplificación de la región no replicada del gen <i>PKD1</i> mediante 3 PCR LR.....	77
Tabla 11.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la amplificación del gen <i>PKD2</i>	77
Tabla 12.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la amplificación del gen <i>GANAβ</i>	77
Tabla 13.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T35-T39 y LR T44-T46.....	78

Tabla 14.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T40-T43	79
Tabla 15.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T1 del gen <i>PKD2</i>	80
Tabla 16.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> para la LR T2, LR T5-T6, LR T7-T8 y LR T9-T10 del gen <i>PKD2</i>	80
Tabla 17.	Reactivos necesarios para prepara la <i>mix</i> de la LR T3-T4, LR T11-T13 y LR T14-T15	81
Tabla 18.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> de la LR T1, LR T12-T19 y LR T20-T25 del gen <i>GANAB</i>	82
Tabla 19.	Reactivos y cantidades necesarias para preparar la <i>mix</i> de la LR T2-T5 y LR T6-T11 del gen <i>GANAB</i>	83
Tabla 20.	Condiciones para amplificar el gen <i>PKD1</i> :	83
Tabla 21.	Condiciones para amplificar el gen <i>PKD2</i>	84
Tabla 22.	Condiciones para amplificar el gen <i>GANAB</i>	84
Tabla 23.	Tamaño de los amplicones.....	85
Tabla 24.	Características de cada diseño <i>in silico</i>	96
Tabla 25.	Parámetros específicos para cada muestra.....	102
Tabla 26.	Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común de 8 genes.....	105
Tabla 27.	Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común de 11 genes.....	106
Tabla 28.	Resultados de los porcentajes de cobertura máxima y media obtenida para cada uno de los genes del panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes	108
Tabla 29.	Parámetros específicos para cada muestra.....	118

Tabla 30.	Representación de la profundidad de lectura para cada muestra y del número de lecturas que mapean en la región diana	120
Tabla 31.	Resultados de los porcentajes de cobertura obtenidos mediante la estrategia de amplicones para los genes <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> y <i>GANAβ</i>	121
Tabla 32.	Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de PKD diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.	124
Tabla 33.	Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de ARPKD diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.	126
Tabla 34.	Variantes identificadas en los pacientes con sospecha clínica de esclerosis tuberosa diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.	126
Tabla 35.	Variantes identificadas en los pacientes para los cuáles no conocíamos la patología de base diagnosticados mediante el panel de enfermedad quística común de 8 genes.	126
Tabla 36.	Variantes identificadas en los pacientes negativos para el panel de 8 genes, los cuáles se diagnosticaron mediante amplicones para la región replicada de <i>PKD1</i>	129
Tabla 37.	Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de enfermedad quística común de 11 genes.	132
Tabla 38.	Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de enfermedad quística común, rara y ultra-rara de 72 genes.	135
Tabla 39.	Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de amplicones para los genes <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> y <i>GANAβ</i>	141

Tabla 40.	Variantes identificadas en los pacientes estudiados genéticamente mediante el panel de amplicones para los genes <i>PKD1</i> , <i>PKD2</i> y <i>GANAB</i>	142
Tabla 41.	Principales manifestaciones extrarrenales en la cohorte de estudio con ADPKD.	189



Índice Figuras

- Figura 1.** Esquema representativo de la estructura del gen *PKD1* y su transcrito más largo (figura adaptada de Torres *et al.*, 2007)..... 29
- Figura 2.** Esquema representativo de los pseudogenes homólogos al gen *PKD1*. La línea de puntos indica las deleciones existentes en los pseudogenes en comparación con el gen funcional. (Figura adaptada de Symmons O. *et al.*, 2008) 29
- Figura 3.** Esquema representativo de la estructura del gen *PKD2* y su transcrito más largo (figura adaptada de Torres *et al.*, 2007)..... 30
- Figura 4.** Representación de las proteínas PC1 y PC2 codificadas por los genes *PKD1* y *PKD2* (figura adaptada de Adrián Cordido *et al.*, 2017)..... 32
- Figura 5.** Morfogénesis tubular. Cuando hay una correcta orientación del huso mitótico y los centrosomas, se produce la división celular en la dirección del eje longitudinal del tubo. Si se pierde esta orientación se produce un ensanchamiento del túbulo en forma de quiste (figura adaptada de Germino G.G., 2005)..... 33
- Figura 6.** Modelo "two hit" de la poliquistosis renal (figura adaptada de Wallace, D. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochim Biophys Acta* (2011) 34
- Figura 7.** Localización de las policistinas y de la proteína codificada por el gen *DZP11L* en el cilio primario (figura adaptada de Bergmann *et al.*, 2018)..... 38
- Figura 8.** Algoritmo para la identificación de pacientes poliquísticos candidatos a ser tratados con tolvaptán (figura adaptada de la guía de *Apunte sobre el uso de tolvaptán para la poliquistosis renal autosómica*

dominante: “Torra R. Apuntes sobre el uso de tolvaptán para la poliquistosis renal autosómica dominante. Fundación Puigvert GTERH-SEN. WGIKD-EDTA”). 52

- Figura 9.** Esquema del flujo de trabajo para la generación de las librerías mediante la tecnología HaloPlex (imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies*). 63
- Figura 10.** Validación de la digestión mediante *TapeStation 2200*. Carril 1: Marcador de peso molecular (*ladder*); Carril 2: control de DNA no digerido; Carriles 3-10: Digestión del control con los 8 pares de enzimas de restricción. (Imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies*). 66
- Figura 11.** Perfil obtenido de la validación de una librería obtenida mediante la tecnología HaloPlex utilizando el *TapeStation 2200* (imagen adaptada del protocolo *HaloPlex Target Enrichment System for Ion Torrent Sequencing, versión D.5, January 2014, Agilent Technologies*). 67
- Figura 12.** Flujo de trabajo desde la amplificación del DNA mediante PCR LR hasta que se prepara la librería para secuenciarla en la plataforma Ion Torrent. 68
- Figura 13.** Perfil obtenido de la validación de la selección por tamaño utilizando el *TapeStation 2200*. El electroferograma muestra fragmentos de DNA de un tamaño medio de 150pb (imagen adaptada del protocolo *SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Solid 5500 Multiplexed Sequencing (Version A1, August 2015, Agilent Technologies)*). 75
- Figura 14.** Esquema de la PCR de emulsión (figura adaptada del protocolo *Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL revisión 6.0*). 86

Figura 15.	Esquema del ensayo de calidad de la amplificación de las Ion Sphere Particles (ISP) (figura adaptada del protocolo <i>Ion PGM™ template OT2 200 kit User Guide, Pub. No. MAN0007220 Rev. 4.0</i>).....	87
Figura 16.	Imagen del secuenciador Ion PGM (figura adaptada de https://www.seqomics.hu).....	88
Figura 17.	Imagen del secuenciador Ion Proton (figura adaptada de https://allseq.com).....	88
Figura 18.	A) Esquema del proceso de secuenciación basada en semiconductores. B) Representación de la superficie del chip con los pocillos donde se cargará cada ISP recubierta de DNA. Por debajo se puede observar el sensor de pH (figura adaptada de https://labmedicineblog.com).	89
Figura 19.	Representación, mediante <i>UCSC Genome Browser</i> , de las regiones cubiertas y las perdidas para el gen <i>PKDI</i> mediante el panel de 8 genes.	97
Figura 20.	Gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular <i>Hyperladder 1, Bionline</i>) y en los carriles 2-12 las muestras DNA. Se puede observar que ninguna de las muestras está degradada... ..	98
Figura 21.	Total de bases leídas, <i>Key Signal</i> y densidad de carga de un <i>Ion 316™ Chip</i>	100
Figura 22.	Gráfico que resume el estado de las ISP durante la secuenciación.....	101
Figura 23.	Gráfica que representa la longitud de las lecturas durante la secuenciación.....	101
Figura 24.	Resumen del alineamiento y calidad de las lecturas....	103
Figura 25.	Parámetros de calidad del fragmento de prueba.....	104
Figura 26.	Visualización en IGV de las lecturas de una muestra (ID: 3281) diagnosticada con el panel de 11 genes. A) Visualización de las lecturas en los exones 2-5 de la región replicada del gen <i>PKDI</i> . B) Visualización de las lecturas en los exones 35-39 de la región no replicada del gen <i>PKDI</i>	111

- Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para las PCR-LR T5-T6 del gen PKD2 para distintas muestras de pacientes (carriles 2-18). En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular *Hyperladder I, Bioline*). 113
- Figura 28.** Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200* tras la fragmentación de los amplicones utilizando el *Covaris® S2 System (Covaris®)*. 114
- Figura 29.** Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200* tras la realización de la selección por tamaño utilizando beads *AMPure XP (Beckman Coulter Genomics)*..... 114
- Figura 30.** Perfil obtenido utilizando la plataforma *TapeStation 2200*. Se observa el perfil de la librería final con un tamaño de los fragmentos en torno a 200pb. 115
- Figura 31.** Representación de distintos parámetros dados por el informe de secuenciación para evaluar el proceso..... 117
- Figura 32.** Resumen del alineamiento y calidad de las lecturas 119
- Figura 33.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 8 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología. 127
- Figura 34.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 8 genes y el test de amplicones para la región replicada del gen *PKD1* en aquellos pacientes que fueron negativos para el panel de 8 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología. 128
- Figura 35.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común de 11 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología. 131

- Figura 36.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística de 72 genes. Entre los pacientes diagnosticados se indica el número y porcentaje de casos asociados a cada patología. 134
- Figura 37.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados con el panel de enfermedad quística común, rara y ultra de 72 genes junto con la región replicada del gen *PKD1* mediante la estrategia de amplicones. 136
- Figura 38.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB*. ... 138
- Figura 39.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* y el panel de 8 genes para aquellos pacientes negativos para la primera prueba. 139
- Figura 40.** Esquema que representa el número y porcentaje de pacientes diagnosticados mediante el test de amplicones para los genes *PKD1*, *PKD2* y *GANAB* y el panel de 72 genes para aquellos pacientes negativos para la primera prueba. 140
- Figura 41.** Representación del número de pacientes recibidos por hospital y año a partir de Enero del 2016 y hasta Septiembre del 2018. 146
- Figura 42.** Representación de la distribución por cada hospital del número de familias al que pertenecen los pacientes enviados dentro del proyecto. 147
- Figura 43.** Comparativa entre el número de familias previamente identificadas (NefroCHUS) y el número de familias nuevas recibidas por cada hospital..... 148
- Figura 44.** Comparativa entre el número de pacientes previamente identificados (NefroCHUS) y el número de pacientes nuevos recibidos por cada hospital. 149

Figura 45.	Representación del número de pacientes que cumplen criterios y del número de muestras que no cumplen los criterios por cada hospital y por cada año del proyecto.	151
Figura 46.	Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHOP.....	153
Figura 47.	Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUOU.....	155
Figura 48.	Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUVI.....	156
Figura 49.	Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el Hospital de Povisa.	158
Figura 50.	Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria Vigo-Ourense, se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético.	160
Figura 51.	Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUF.....	162

- Figura 52.** Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUAC. 163
- Figura 53.** Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria A Coruña-Ferrol, se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético. 165
- Figura 54.** Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el CHUS..... 166
- Figura 55.** Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el HULA. 167
- Figura 56.** Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o con la mutación no identificada) y de los genes mutados para las familias recibidas dentro del Proyecto desde el Hospital de Burela. 169
- Figura 57.** Para cada hospital perteneciente al Área Sanitaria Santiago-Lugo se especifica por cada hospital, el número de pacientes que cumplen criterios de inclusión en el proyecto y el número de pacientes que no los cumplen (separado por motivos), del total de pacientes que resultaron no resueltos genéticamente tras la realización del estudio genético. 170
- Figura 58.** Representación del número y porcentaje de familias con diagnóstico genético positivo (o negativo) y de

los genes mutados para la cohorte de familias gallegas.	171
Figura 59. Clasificación de las variantes identificadas en el gen <i>PKD1</i> en cinco categorías: <i>nonsynonymous SNV</i> , <i>frameshift ins/del</i> , <i>stopgain</i> , <i>in frame ins/del</i> y <i>splicing</i>	173
Figura 60. Clasificación de las variantes identificadas en el gen <i>PKD2</i> en cuatro categorías: <i>nonsynonymous SNV</i> , <i>frameshift ins/del</i> , <i>stopgain</i> y <i>splicing</i>	174
Figura 61. Representación de las edades de diagnóstico de los pacientes de la cohorte. Se representan por grupos de edad.	176
Figura 62. Representación de los principales motivos de diagnóstico para la cohorte de pacientes.	177
Figura 63. Prueba de normalidad para la variable edad. Como el p valor es superior a 0.05 se considera que los datos cumplen los criterios de normalidad.	178
Figura 64. Prueba de normalidad para la variable CK-EPI (ecuación utilizada para estimar la GFR). Como el p valor es superior a 0.05 se considera que los datos cumplen los criterios de normalidad.	178
Figura 65. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics.	179
Figura 66. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la población de pacientes con mutación en el gen <i>PKD1</i>	180
Figura 67. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la población de pacientes con mutación en el gen <i>PKD2</i>	181
Figura 68. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para los pacientes con mutaciones <i>PKD1</i> truncantes y <i>PKD1</i> no truncantes ..	182
Figura 69. Representación de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para los pacientes con mutaciones <i>PKD2</i> truncantes y <i>PKD2</i> no truncantes ..	183

Figura 70. Representación y estadística de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la cohorte de pacientes de este estudio portadores de mutación de tipo truncante en los genes PKD1 y PKD2. 185

Figura 71. Representación y estadística de los datos obtenidos mediante el programa IBM SPSS Statistics para la cohorte de pacientes de este estudio portadores de mutación de tipo truncante en los genes PKD1 y PKD2 186

Figura 72. Clasificación de los pacientes en función del estadio de enfermedad renal crónica en el que se encuentran y dentro de cada estadio se clasifican en función de si manifiestan HTA o no. 187

Figura 73. Representación de los pacientes de la cohorte de estudio en terapia renal sustitutiva..... 188

