



SaludMadrid

Hospital Universitario
12 de Octubre

Uso de la técnica Droplet Digital PCR (ddPCR) en cáncer de próstata resistente a la castración mediante biopsia líquida

Carolina Guerrero
Amelín



Buenos días, mi nombre es Carolina Guerrero Amelín. Me gradué en Biología Sanitaria en la Universidad de Alcalá y realicé el máster en dianas terapéuticas en señalización celular. Actualmente estoy trabajando como investigadora biomédica en el Hospital universitario 12 de Octubre de Madrid.

En esta presentación voy a explicar cómo funciona la ddPCR o droplet digital PCR y la importancia que presenta en el pronóstico de la biopsia líquida en cáncer de próstata avanzado.

01 ddPCR

Δnúmero copias de AR



A lo largo de la presentación comentaré los diferentes procedimientos llevados a cabo con las biopsias líquidas hasta la obtención de los resultados. Finalizaré la presentación con una primera aproximación de los resultados obtenidos a partir de los estudios Foundation One.

La ddPCR o droplet digital PCR es una técnica que permite el análisis molecular de la sangre de pacientes con cáncer. En el plasma se obtiene principalmente el ADN tumoral circulante libre extracelular derivado de tumores primarios, células tumorales circulantes (CTC) lisadas y exosomas.

Esta técnica la cual no es invasiva, supone una gran revolución tanto en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad., permitiendo detectar y analizar el ADNct. La ddPCR presenta una alta sensibilidad y precisión requiriendo personal cualificado para su utilización.

ddPCR

Procesamiento de muestras

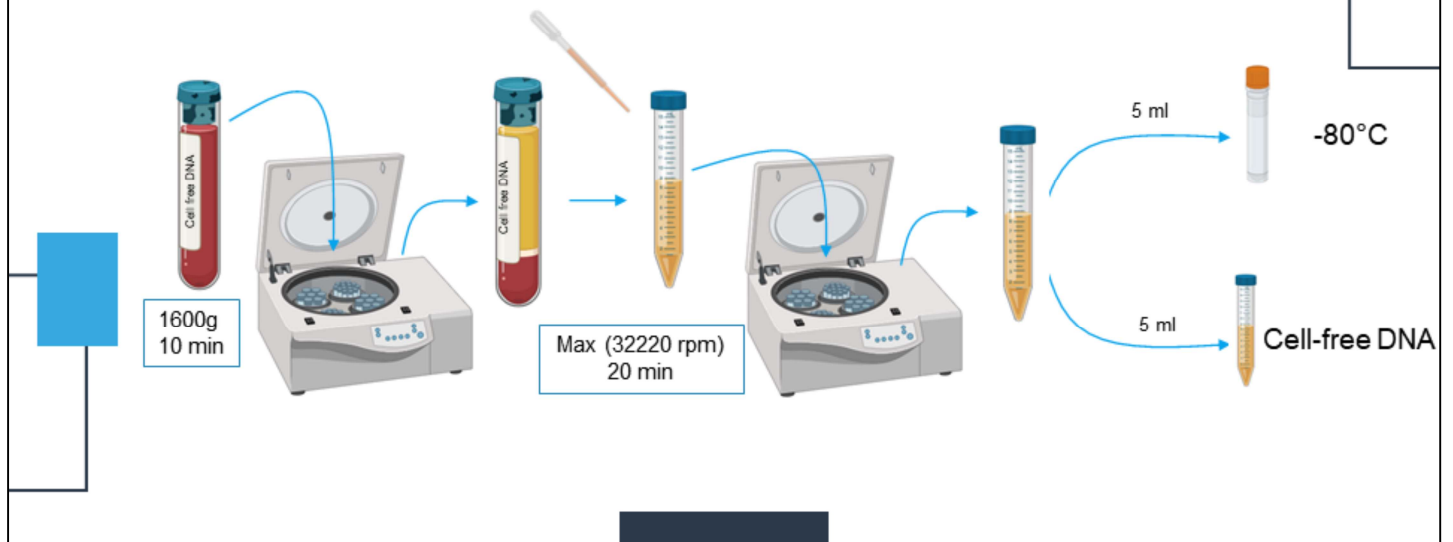
1. Obtención del plasma
2. Extracción del DNA libre circulante (cfDNA)
3. Cuantificación del dsDNA circulante
4. ddPCR (droplet digital PCR)

Para ello, estos son los pasos previos que se tienen que llevar a cabo:

ddPCR

Procesamiento de muestras

1. Obtención del plasma



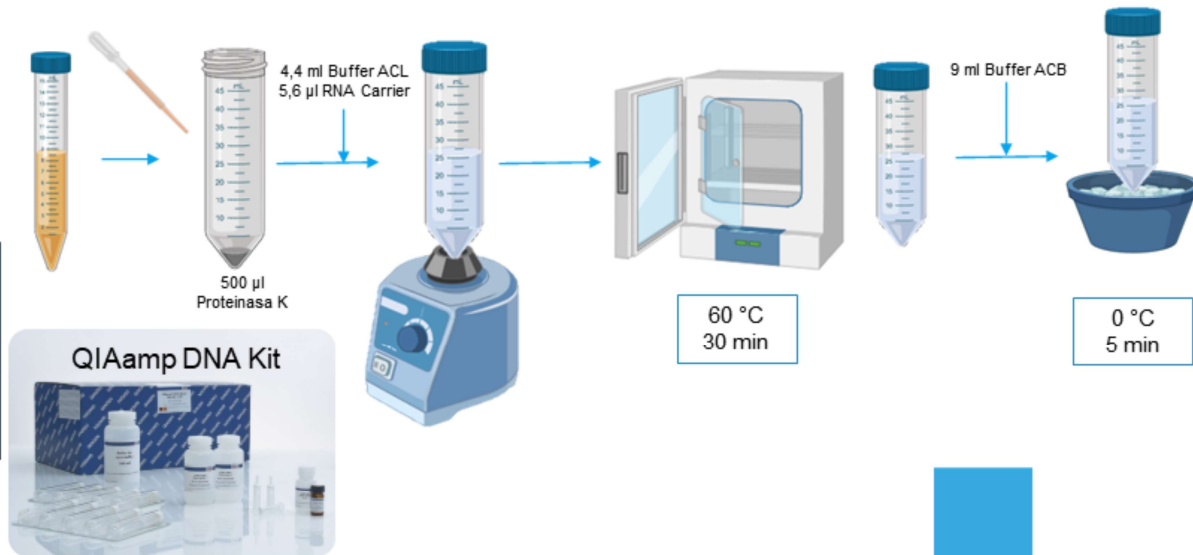
Lo primero que sucede en el procesamiento de las muestras sanguíneas es la obtención del plasma.

- Estas muestras vienen en tubos Streck que permiten estar conservadas hasta un total de 2-3 días a temperatura ambiente para obtener resultados óptimos.
- Las muestras se centrifugan a 1600g durante 10 minutos para obtener la separación correcta del plasma, el cual se recoge en Falcon de 15 mL y se vuelve a centrifugar por 2º vez a máxima velocidad (32.220 rpm) durante 20 minutos.
- Una vez centrifugadas las muestras de plasma, se obtiene aproximadamente unos 10 mL que se reparten de forma que la mitad del contenido se conserva a -80 °C para ampliar el biobanco, mientras que la parte restante se utiliza para extraer el ADN tumoral libre circulante (ADNct) del ADN libre circulante (ADNcf)

ddPCR

Procesamiento de muestras

2. Extracción del DNA libre circulante (cfDNA)



El siguiente paso es la extracción del ADN libre circulante. Para ello, se utiliza el kit de extracción de ADN QIAamp DNA Kit.

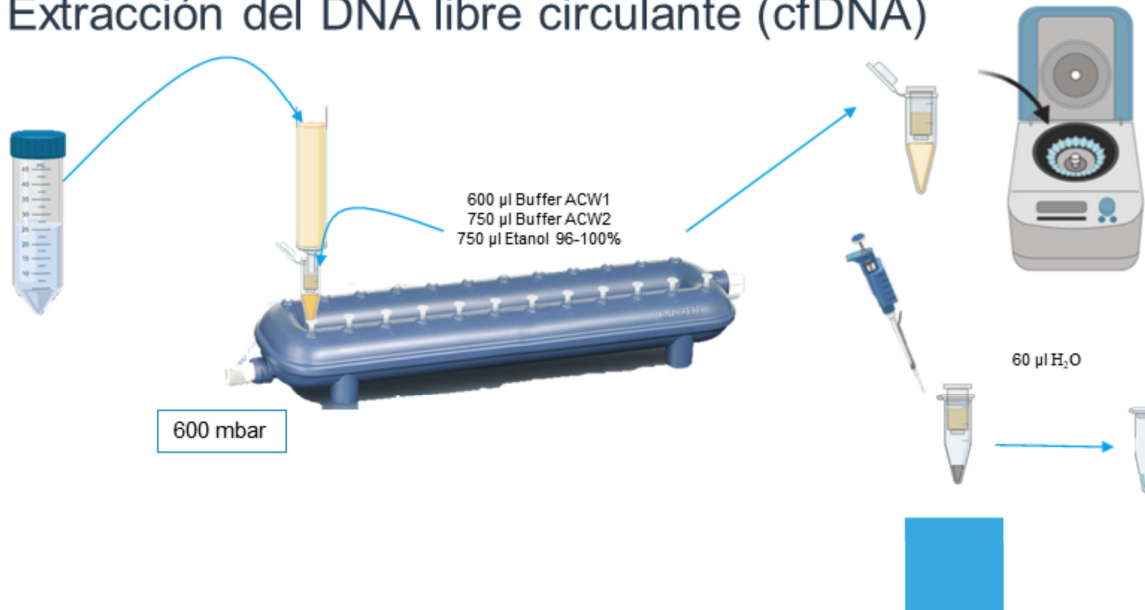
Los pasos a realizar se encuentran recogidos en el protocolo del kit.

- Se añade en un Falcon de 50 mL 500 µl de proteinasa K, seguido de 4-5 ml del plasma obtenido anteriormente y 4,4 ml de Buffer ACL y 5,6 µl de ARN Carrier. Se homogeniza bien en un vórtex y se incuba a 60°C durante 30 minutos para activar la proteinasa K. Posteriormente se añade 9 ml de Buffer ACB y se incuba 5 minutos en hielo.

ddPCR

Procesamiento de muestras

2. Extracción del DNA libre circulante (cfDNA)

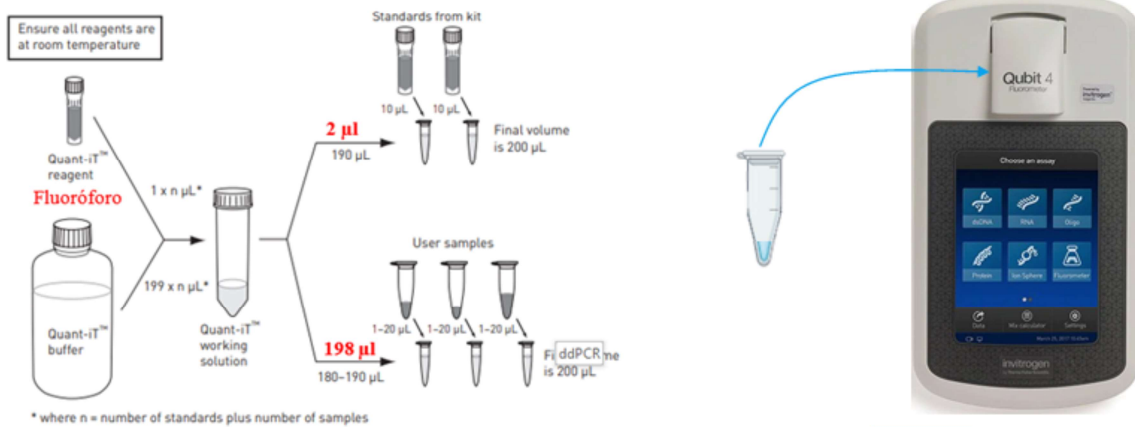


- Para facilitar la extracción, se utiliza el QuiAvac 24 Plus acoplado a una bomba de vacío, en donde se colocan las columnas de extracción. Se añade la mezcla y se abre la bomba de vacío para que todo el contenido pase por la columna. Al finalizar, la columna se lava con 600 µl de Buffer ACW1, 750 µl de Buffer ACW2 y para finalizar 750 µl de etanol al 96%.
- A continuación, se coloca un eppendorf debajo de la columna y se centrifuga a máxima velocidad para secar completamente la membrana.
- Para evaporar el posible resto de etanol, se colocan las muestras en el termobloque a 56 °C durante 10 minutos con la tapa abierta.
- Finalmente se pasa la columna a un eppendorf limpio y se añade 60 µl de H₂O estéril para eluir el DNA. Se finaliza el proceso de extracción centrifugando la muestra a máxima velocidad durante 1 minuto, obteniendo el ADNcf.

ddPCR

Procesamiento de muestras

3. Cuantificación del dsDNA circulante

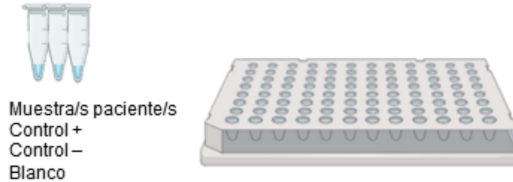
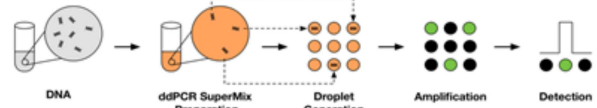


Para la cuantificación del ADN de doble cadena se utiliza el kit de ensayo HS de dsDNA Qubit™, junto con el Qubit. Se preparan los estándares para ser analizados junto con la muestra obtenida y obtener la concentración de la muestra.

ddPCR

Procesamiento de muestras

4. ddPCR (droplet digital PCR)



Muestra/s paciente/s
Control +
Control -
Blanco

Componentes	Volumen (µl) / muestra
ddPCR 2x Supermix for Probes (no dUTP)	10
20x Primers/sonda (HEX)	1
20x Primers/sonda (FAM)	1
Enzima de restricción	1
cdDNA	1-2 ng
H ₂ O estéril	Variable (máximo 6)

Una vez procesadas las muestras, se preparan las mix a utilizar, junto con los controles (+) y (-) y el blanco. Se establece una plantilla para ordenar las muestras en una placa de 96 pocillos, ya que se requiere 1 cartucho por cada fila, evitando que se desperdicien.

Cada pocillo contendrá la supermix, los primer de las regiones a amplificar unidos a sondas (HEX y FAM), enzima de restricción para facilitar la acción de los primers, el ADNcf y H2O.

ddPCR

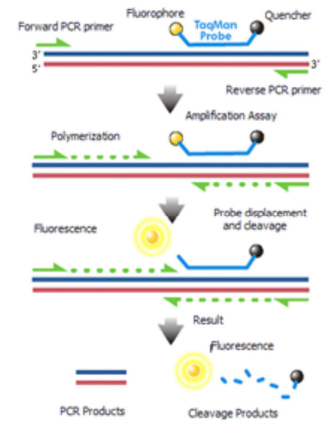
Procesamiento de muestras

4. ddPCR (droplet digital PCR)



Muestra paciente
Control +
Control -
Blanco

Nombre	Fluoróforo	Purificación	Quencher	Longitud amplicón (pb)	Casa Comercial	Enzima de restricción recomendada
AR	FAM	HPLC	Iowa Black	70	Life Technologies	Hae III
ZXDB	FAM	HPLC	Iowa Black	78	Life Technologies	Hae III
NSUN3	HEX	HPLC	Iowa Black	70	Bio-Rad	Hae III
AP3B1	HEX	HPLC	Iowa Black	85	Bio-Rad	Hae III
EIF2C1 (AGO1)	HEX	HPLC	Iowa Black	86	Bio-Rad	Hae III

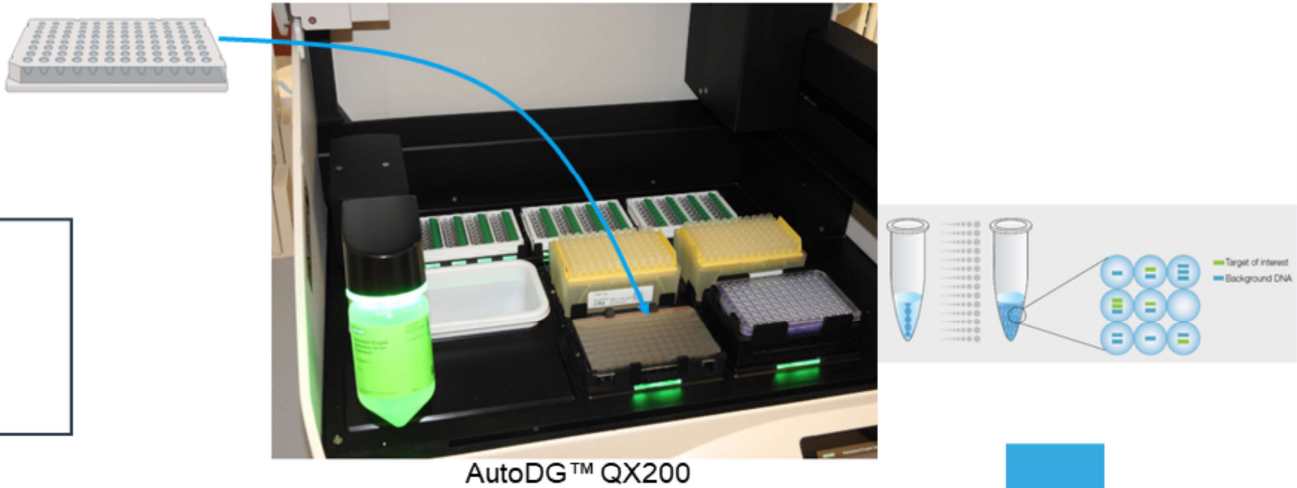


Para estudiar el número de copias del receptor androgénico (AR), se utilizaron los siguientes primers.

ddPCR

Procesamiento de muestras

4. ddPCR (droplet digital PCR)

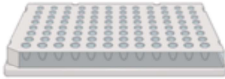


La placa multipocillo es sellada con un sellador de placas a 180 °C e introducido en el AutoDG™ QX200. En este proceso, el robot se encarga de aspirar la muestra de cada pocillo y generar gotas con el aceite. Es por ello que cada gota contiene ADN junto con los reactivos para que tenga lugar la reacción de amplificación. Las 20.000 nanogotas aproximadas generadas por cada pocillo son depositadas en otra placa multipocillo.

ddPCR

Procesamiento de muestras

4. ddPCR (droplet digital PCR)



Termociclador C1000 Touch



Lector QX200

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Activación enzima	95 (99)	10 min	1
Desnaturalización	94 (95)	30 seg (15 seg)	40
Annealing/ extensión	(60)	1 min	
Desactivación enzimática	98	10 min	1
Mantenimiento	4	Infinito	1

A continuación, la placa es introducida en el termociclador, utilizando el programa proporcionado por la compañía para amplificar el ADNcf. Al terminar la amplificación, la placa multipocillo es introducida en el Lector QX200 previamente configurado, para ser leída.

ddPCR

Procesamiento de muestras

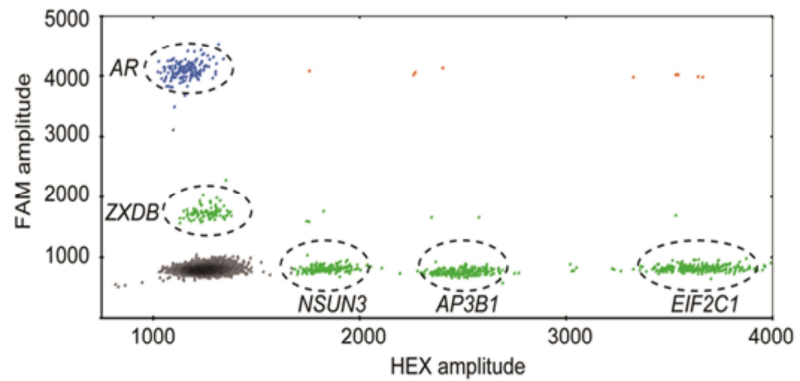
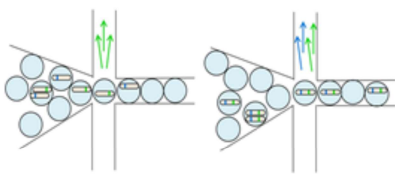
4. ddPCR (droplet digital PCR)



Negative Mixed Sample

Positive Sample

EHEC




Tras la lectura, el lector analiza cada gota de forma individual haciéndolas pasar de una a una. Este lector utiliza un sistema basado en la detección de 2 fluoróforos, FAM y HEX. Las gotas que son positivas y por tanto contienen al menos 1 copia del ADN diana tienen un incremento en la fluorescencia en comparación con las gotas que son negativas.

Finalmente, el programa establece un threshold calculando las gotas positivas y negativas.


Un ejemplo de ello es la imagen situada a la derecha.

En la parte superior se observa las gotas que son positivas para AR y que por ello muestran 2 copias del gen, en comparación con el gen ZXDB usado como control, el cual solo presenta 1 copia por hallarse en el cromosoma X. Además, se utilizaron los controles NSUN3, AP3B1 y EIF2C1.

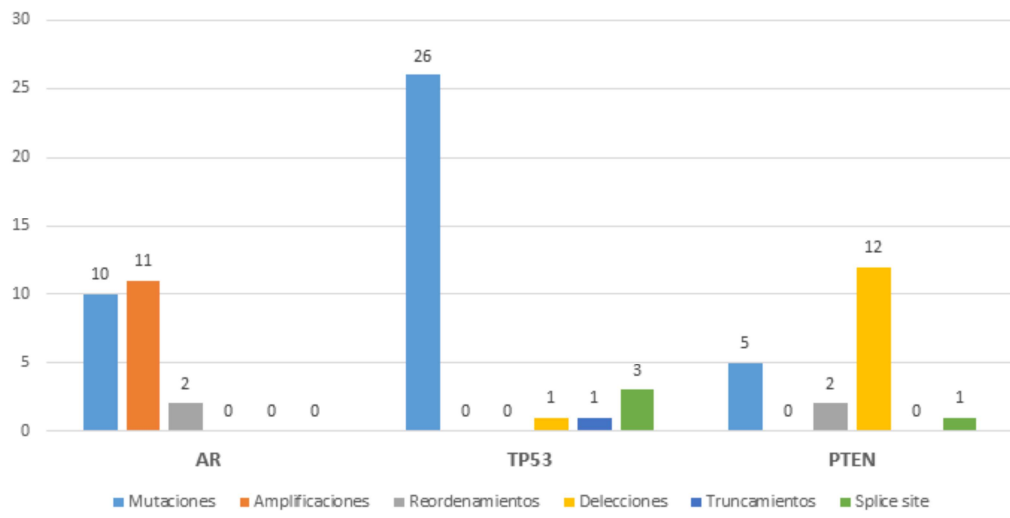
De esta forma, poniendo a punto este panel, se puede analizar cada muestra de sangre de pacientes con cáncer de próstata para observar si presentan variaciones en el número de copias en el receptor androgénico.



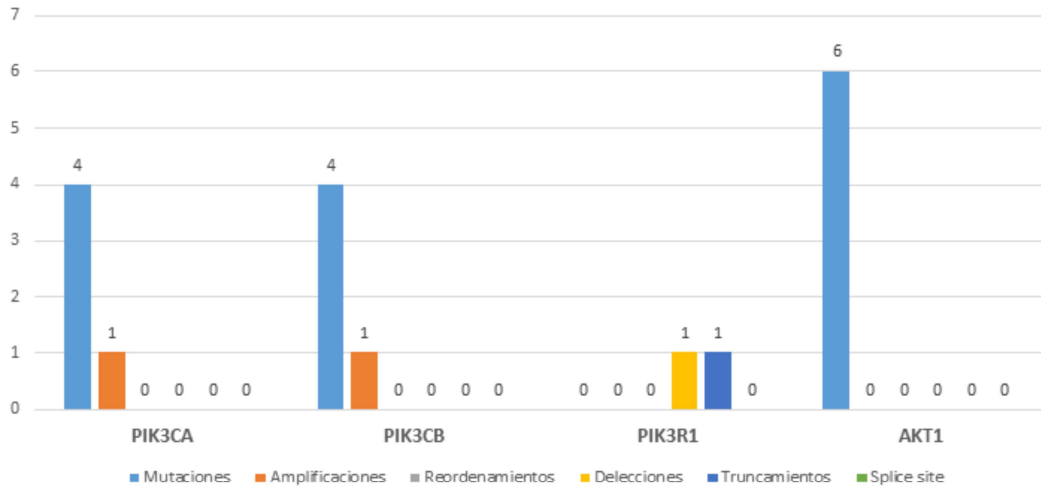
Escenarios no estudiados de
pacientes no sensibles
tratados con hormonoterapia
como 1º tratamiento



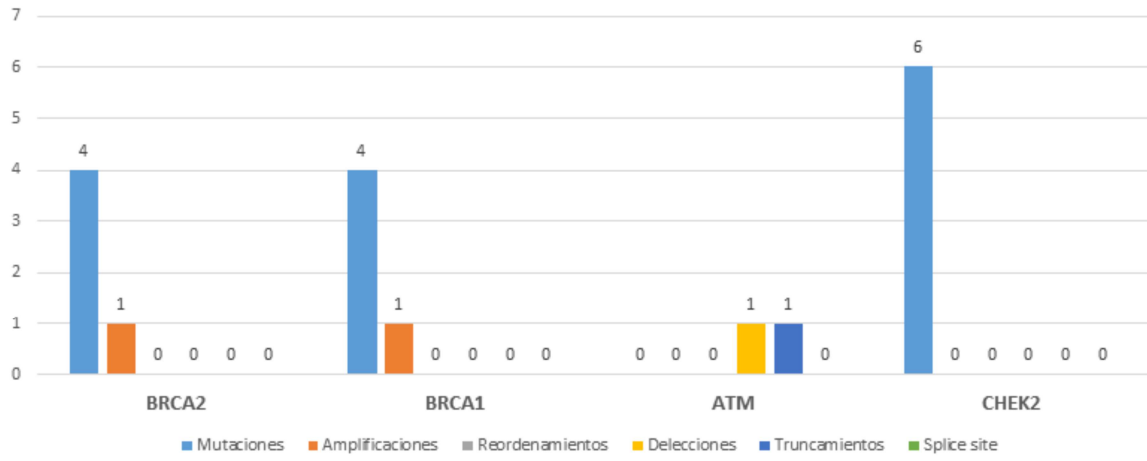
Vía AR



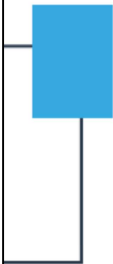
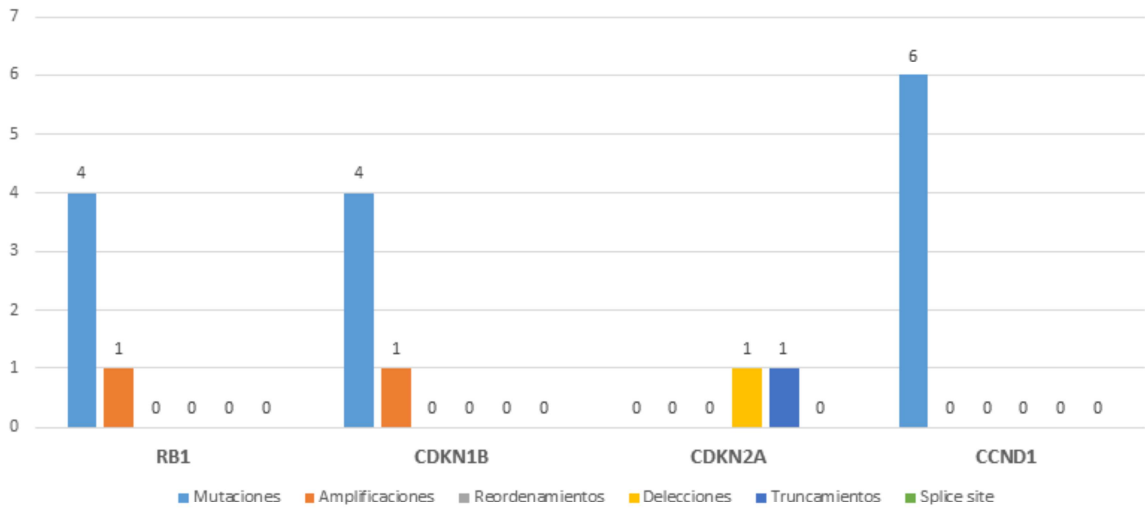
Vía PI3K-AKT

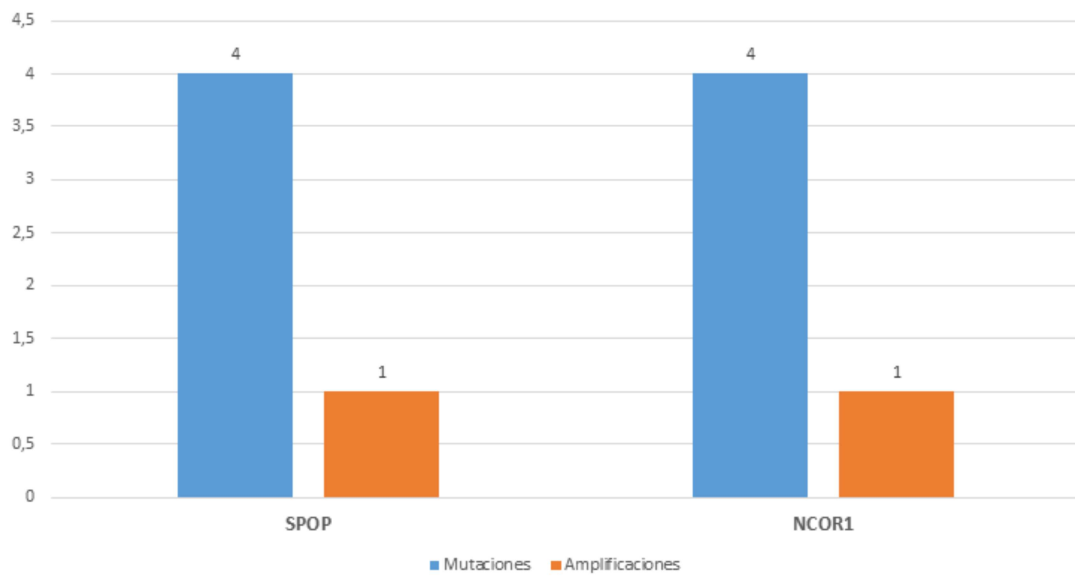


Reparación DNA



Ciclo celular







Hospital Universitario
12 de Octubre

Gracias por su atención



carolina.guerreroamelin@gmail.com



enrique.gonzalezbilla@gmail.com

i+12

Instituto de Investigación
Hospital 12 de Octubre