

Diseño de un fijador para la preservación de ADN tumoral libre circulante en sangre para biopsia líquida

Aguilera Moscoso Beatriz del Carmen ¹; Albisua Bermúdez Hector^{2*}; Alvarez Moro Araceli ³; Ramón Carrasco Salma Marselha⁴; Rodríguez Gopar Ana Victoria ⁵; (Alumnos de quinto semestre de la licenciatura en ingeniería química); Montilla Fonseca Silvia Mariela¹

¹Universidad Iberoamericana Puebla, México, betty31609@gmail.com; ²Universidad Iberoamericana Puebla, México, hector.albisua.98@gmail.com; ³Universidad Iberoamericana Puebla, México, aralvamoro@hotmail.com; ⁴Universidad Iberoamericana Puebla, México, salmamarselha@hotmail.com; ⁵Universidad Iberoamericana Puebla, México, rganavictoria@gmail.com; LA silvia.montilla@labopat.com

Resumen

La manera de diagnosticar cáncer implica procedimientos que algunas veces llegan a ser peligrosos para el paciente, sin embargo, actualmente existen procesos alternos no invasivos llamadas biopsias líquidas, que mediante la extracción de fluidos corporales, como las muestras sanguíneas, es posible purificar y analizar ADN procedente de los tumores, denominado ADN tumoral libre circulante. Este ADN sin células se refiere a todo el ADN no encapsulado en el torrente sanguíneo. La importancia de este proyecto radica en que en México no existen opciones para la preservación de esta biomolécula, ya que el mercado se ve restringido por cuestiones de importación, adicional a esto, está el factor de vida útil de la muestra; dado que el uso de la misma debe ser inmediato debido a su inestabilidad molecular. Por este motivo, se tiene como objetivo diseñar un fijador para la preservación de ADN libre circulante, el cual facilite la conservación y estabilidad del ADN bajo un período de tiempo post extracción. El desarrollo del proyecto comienza con la identificación de los agentes estabilizadores de la molécula bajo condiciones ambientales; se definió una formulación basada en cinco componentes: anticoagulante, buffer, preservativo, inhibidor de nucleasas, e inhibidor de proteasa. Por último, se hicieron pruebas con muestras de biopsia líquida, comprobando por medio de electroforesis la adecuada conservación del ADN de interés posterior a la aplicación del fijador. Finalmente, se obtuvo como resultado un conservador capaz de mantener estable la biomolécula deseada durante un lapso de tiempo dentro del cual se podrían efectuar análisis exitosos de identificación de cáncer.

Palabras clave: Biopsia líquida, ADN libre circulante (cfDNA), biomolécula, estabilizador.

Introducción

En la actualidad existen limitados métodos de detección de cáncer, los cuales suelen ser altamente invasivos y resultan perjudiciales para el paciente, la alternativa a esto es la biopsia líquida, la cual resulta ventajosa sobre una biopsia de tejido o convencional, ya que solo se necesita como muestra inicial un fluido corporal, el cual es mucho más fácil de obtener, y a partir de ello se detectan posibles indicadores de cáncer en el organismo. Para pacientes en estado crítico o con enfermedades como cáncer de pulmón, no es posible realizar una extracción de tejido debido al alto riesgo de sangrado, lesión nerviosa o diseminación de enfermedades [1]; es aquí donde entran las biopsias líquidas, a partir de las cuales se puede tener mayor información sobre el perfil mutacional del tumor a medida que este evoluciona y adicionalmente se puede tomar una biopsia de este tipo en los diferentes estados de la enfermedad, lo que le permite al médico tomar decisiones terapéuticas más acertadas,

La biopsia líquida es el método mediante el cual se toma un fluido corporal para purificar ADN libre circulante, o cfDNA por sus siglas en inglés, el cual se refiere a todo el ADN no encapsulado en el torrente sanguíneo, una porción de este se origina a partir de un clon tumoral y se denomina ADN tumoral libre circulante [2].

El problema del cfDNA radica en que las cantidades presentes en una muestra son sumamente escasas, pues existen de 1.6 a 23.7 ng por cada mL de plasma, y se degradan rápidamente por las enzimas DNAsa presentes en el torrente, dándole una vida media de 16 minutos [3]. Otro reto es la necesidad de técnicas de extracción de ADN capaces de recuperar fragmentos muy pequeños de este y evitar la contaminación del ADN libre circulante con el ADN genómico liberado de los glóbulos blancos. Uno de los mayores inconvenientes es que el cfDNA comienza a degradarse con el tiempo desde el punto de extracción de sangre [4]. Esto último resulta problemático cuando las muestras de sangre se recolectan lejos del centro donde se realizan las pruebas moleculares y deben enviarse a largas distancias; por lo tanto, es necesario utilizar un conservador adecuado para la posterior extracción y procesamiento de la sangre para garantizar la recuperación del cfDNA y, en consecuencia, una mayor tasa de éxito en las pruebas de diagnóstico. Además de su versatilidad para cuestiones patológicas la evaluación del cfDNA por medio de biopsia líquida permite tener un mayor acceso a las mutaciones que las células tumorales pudieran llegar a tener, dado que los tumores cambian perfil mutacional al evolucionar el ser humano y es necesario identificar los cambios mutacionales que sufre el tumor para realizar un adecuado monitoreo de la enfermedad.

A pesar de que se han desarrollado tubos de recolección de sangre que contienen un agente de fijación capaz de conservar las células sanguíneas y, retrasar su degradación [5], en México no se encuentran disponibles dichas opciones para la preservación de esta biomolécula, pues el mercado se ve limitado por cuestiones de costos y restricciones de importación. La motivación del proyecto nace a partir de esta problemática, y se tiene como objetivo diseñar un fijador de preservación de cfDNA, el cual facilite su conservación, por lo que si se busca transportar la muestra para biopsia líquida para un paciente que necesite un diagnóstico especializado, no ocurra degradación y se pueda analizar correctamente.

Metodología

La elaboración del proyecto fue basada en los siguientes pasos:

1. Se elaboró el suero preservador de ADN libre circulante utilizando cinco componentes básicos: Anticoagulante, Buffer, Preservativo, inhibidor de nucleasas y un inhibidor de proteasa.
 - a. Base salina (70.5%)
 - b. El anticoagulante se emplea con el fin de evitar el taponamiento de las columnas de sílica (6%)
 - c. Buffer para la estabilización y regulación del pH ideal (1%)
 - d. Preservativo para la estabilización de los extremos parcialmente negativos de las cadenas de ADN (18%)
 - e. Inhibidor de nucleasas para eliminar su actividad enzimática que degrada las cadenas de ADN (2.5%)
 - f. Inhibidor de proteasa para eliminar la acción de las proteínas que causan que se desnaturalice el ADN (2%)
2. Para la fabricación del solvente preservador, al cual se le denominó cfDNA primer, se seleccionaron tres variables del componente preservativo, con la finalidad de encontrar los reactivos ideales que presentaran un mayor beneficio en cuanto a la obtención de cfDNA y conservación de propiedades de la sangre.
3. Después de obtener las formulaciones para cada cfDNA primer (F1, F2, F3), se realizaron tres pruebas correspondientes a las tres variables de preservativo con muestras sanguíneas de voluntarios.
4. El ADN fue extraído a partir del plasma sanguíneo de cada una de las muestras problema y de un control (plasma fresco sin fijador), usando un kit comercial basado en columnas de sílica.
 - a. La primera extracción se hizo el mismo día, transcurridas 5 horas de la adición del fijador con la sangre.
 - b. La segunda extracción se realizó pasadas 24 horas de la adición del fijador con la sangre.
5. Después de la purificación el ADN fue amplificado por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar su presencia.
6. Para visualizar los productos de la PCR se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa para visualizar el ADN y valorar su calidad y cantidad.
7. En base a esta observación, se hizo la selección del fijador que tuviera mayor cantidad de cfDNA; siendo este el fijador a incluir para la selección final del proyecto.

Resultados y Discusión

Los tres fijadores elaborados (F1, F2, F3) tuvieron efectos distintos sobre la muestra, los que pudieron ser observados antes de realizar la extracción de ADN y que causaron problemas.

Fijadores:

F1. Presentó coagulación nula, aunque causó que los eritrocitos se lisaran. La lisis de los eritrocitos causa la liberación de la hemoglobina que es un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una de las técnicas principales para la identificación de mutaciones.

F2. Presentó una coagulación media, se decidió salvar dicha muestra y se procesó en otra columna de sílice con la intención de tener cantidades óptimas de ADN.

F3. Presentó coagulación y por este motivo se decidió descartarlo, ya que la columna presentaría taponamiento y la cantidad de ADN no iba a ser representativa.

Debido a esto, las formulaciones de los fijadores fueron modificadas y se repitió la misma metodología.

Del análisis por electroforesis se obtuvieron los siguientes resultados:

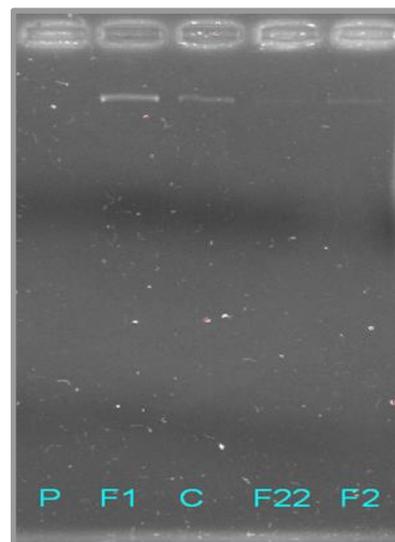


Figura 1. ADN extraído mediante técnica electroforesis

La presencia de ADN en una muestra usando electroforesis en gel de agarosa es visualizada gracias al uso de un tinte intercalante que hace fluorescer al ADN después de la transiluminación con luz U.V., las moléculas de ADN se observan como bandas brillantes, donde la cantidad de ADN presente es proporcional a la intensidad y grosor de las bandas.

A partir de las muestras tratadas con el fijador 2 (F2 y F2.2), se obtuvo poco ADN, lo que se observó como bandas poco visibles.

En el caso del fijador aplicado únicamente al plasma no se observó presencia de ADN pues no hay ninguna banda. En el caso del fijador 1, se puede notar de forma más nítida la banda, lo que indica que hay presencia de ADN, pero en menor cantidad.

Cuando el fijador se mezcló con el plasma sanguíneo, y no con la sangre, y se almacenó a temperatura ambiente no se obtuvo cfDNA (carril P de la figura 1).

La mayor cantidad de cfDNA fue obtenida con el fijador 1 (F1), tal y como se puede ver en la Figura 1.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de electroforesis se comprueba que se obtuvo una formulación para el fijador, el cual conservase adecuadamente la molécula parcialmente negativa del ADN, y pudiera conservar estable la molécula durante cierto periodo de tiempo.

Se pudo observar que hubo presencia de cfDNA en cada una de las muestras con los dos fijadores puestos a prueba, pero el que presentó mayor cantidad fue F1, por lo que se llegó a la conclusión de que este es la mejor opción a usar en casos de análisis y manejo patológico para el tratamiento de cáncer, así como es recomendable aplicarlo a muestras sanguíneas sin separar, pues directamente en plasma no se detecta presencia de la molécula.

Finalmente, en relación con el objetivo del proyecto, se puede decir que se logró adecuadamente, ya que el diseño del fijador orientado para la preservación de cfDNA en muestras sanguíneas para biopsia

líquida se obtuvo y se respalda en los resultados observables en la electroforesis. Sin embargo, debido a la complejidad y retos que implica trabajar con cfDNA, seguiremos haciendo pruebas que mejoren nuestros fijadores y a futuro demostrar que pueden mantener la estabilidad del cfDNA en biopsia líquidas basadas en sangre destinadas a estudios moleculares para la identificación de biomarcadores asociados a enfermedades como el cáncer.

Referencias

[1] Sholl LM, et al. "Liquid biopsy in lung cancer: a perspective from members of the pulmonary pathology society." *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(8):825–9.

[2] M. Neumann, S. Bender, T. Krahn & T. Schlange. "ctDNA and CTCs in liquid Biopsy- Current Status and where we need to progress." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16 (2018) 190–195

[3] S. Breitbach, S. Tug, S. Helmig, *et al.* "Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma". *PLoS ONE* 2014; 9: e87838.

[4] van Ginkel JH, van den Broek DA, van Kuik J et al. "Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using Droplet Digital PCR for future molecular cancer diagnostics." *Cancer Med* 2017; 6: pp. 2297–2307.

[5] Q. Kang, et al. "Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes". *Official Journal of the Canadian Society of Clinical Chemists*. pp. 1354- 1360.