

Validación de la metodología Whole Genome Amplification en la Colección de Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana

Ahicart A. ¹, Bonora-Centelles A. ^{1,3}, García Z. ², Ramírez M. ², Gómez J. ³, Abril C. ¹, Sifres L. ¹, García N. ¹, López-Guerrero J.A. ², Martínez J. ^{1,3}.

¹ Biobanco para la Investigación Biomédica y en Salud Pública de la Comunidad Valenciana (Biobanco IBSP-CV); ² Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Valenciano de Oncología (IVO); ³ Red Valenciana de Biobancos (RVB)

Introducción

Son muchas las situaciones en el laboratorio en las que disponer de pequeñas cantidades de DNA supone un grave problema a la hora de poder llevar a cabo estudios genéticos o genómicos tanto en investigación, como en diagnóstico. En el Biobanco IBSP-CV, se plantea la posibilidad de implantar en el laboratorio una de las metodologías Whole Genome Amplification (WGA), con el fin de poder incrementar la cantidad de aquellas muestras comprometidas.

Objetivos

El objetivo principal del proyecto es llevar a cabo una validación de la metodología WGA en la Colección de Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana tratando de obtener una evaluación tanto técnica (kit, rendimiento y efectividad del producto), como económica.

Materiales y métodos

Solicitud de la muestra a la Red Valenciana de Biobancos (RVB):

- Muestra de DNA de Cáncer Hereditario, con bastantes variantes en el genoma
- 25 ng/ μ L
- 4 diluciones seriadas 1:5 con H₂O (n=1 \rightarrow n=5) (Figura 1)

Tras la realización del protocolo del kit en muestras a diferente concentración, se procedió a evaluar:

- Viabilidad técnica:
 - Manejo del kit
 - Rendimiento de amplificación
 - Estudio comparativo entre las secuencias antes y después de la amplificación
- Viabilidad económica

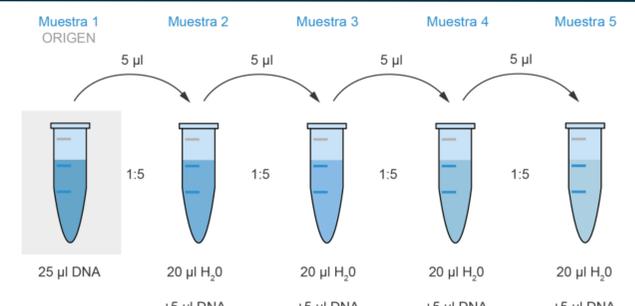


Figura 1. Diluciones seriadas de la muestra de origen con el fin de obtener 5 muestras a diferentes concentraciones con las que realizar el experimento.

Resultados y conclusiones

Viabilidad técnica:

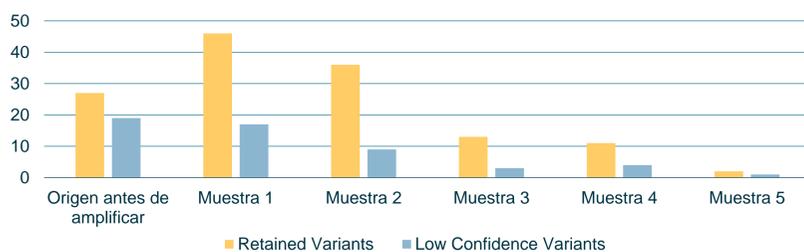
El kit de amplificación seleccionado ha resultado de fácil y cómodo manejo, sin requerimientos específicos en cuanto el fungible y equipamiento necesario.

Con los resultados de la tabla 1 se observa cómo va aumentando considerablemente el rendimiento de la técnica WGA cuanto menor es la cantidad de DNA sometido al proceso.

	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4	PROMEDIO
MUESTRA 1	1:3	1:3	1:20	1:8	1:8
MUESTRA 2	1:12	1:12	1:70	1:37	1:33
MUESTRA 3	1:6	1:1	1:316	1:117	1:110
MUESTRA 4	1:233	1:222	1:3641	1:860	1:1239
MUESTRA 5	1:4735	1:6876	1:29116	1:15486	1:14053

Tabla 1. Rendimientos obtenidos en las diferentes amplificaciones según la concentración de partida

En la muestra 1, que es la más concentrada, se observa un rendimiento en todas las réplicas mucho menor que en las muestras de menor concentración. Aun así, el rendimiento obtenido reside muy por debajo del rendimiento teórico, excepto en las muestras 5 (Tabla 1) y, esto, ha derivado en una mala amplificación en diversos exones de los genes BRCA1 y BRCA2 secuenciados, no solo en la generación de polimorfismos de nucleótido simple (Gráfica 1 y Tabla 2) sino también en la fragmentación de DNA (Gráfica 2). Puede haber sido generado por una polimerasa defectuosa o por una inexperiencia en el manejo del kit.



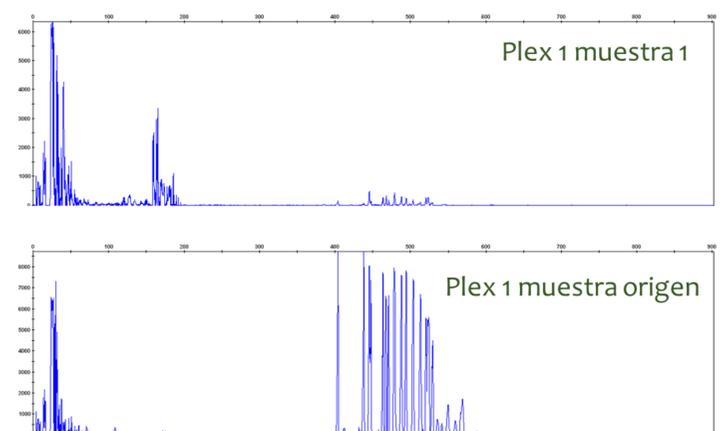
Gráfica 1. Representación de la comparación de número de variantes tanto RV como LCV de las diferentes muestras.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Variante que ha adicionado	32	16	5	6	2
Variante que ha detraído	17	18	35	37	45
Variante idénticas	29	28	11	9	1

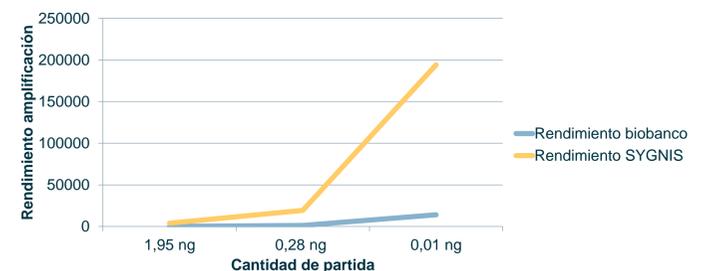
Variante que existen todas las muestras: 1

Variante que solo están presentes en la original: 15

Tabla 2. Número de variantes adicionadas, detraídas e idénticas de las diferentes muestras respecto a la original.



Gráfica 2. Comparación de los fragmentos tras la PCR de amplificación de los genes de interés en la muestra de origen y en la muestra amplificada por WGA. Se observa en la original que los fragmentos están alrededor de unos 480 pb y en la muestra amplificada existe muy poca cantidad de fragmentos con esta longitud. Ocurre lo mismo con el resto de muestras por lo que no es dependiente de la concentración inicial.



Gráfica 3. Comparación de los rendimientos entre las amplificaciones realizadas en el proyecto y las amplificaciones realizadas por la casa Sygnis de las mismas muestras y dependiendo de la cantidad de DNA de partida.

Estas mismas muestras se enviaron de nuevo a amplificar a la casa SYGNIS y en la gráfica 3 se puede observar una clara diferencia de rendimientos.

En general, estos resultados obtenidos abren nuevos objetivos a corto plazo, como es llevar a cabo una nueva línea de investigación con un tamaño muestral mayor y diverso, y el análisis de distintas metodologías y kits existentes en el mercado. Así, este trabajo puede considerarse una primera aproximación (o prueba piloto) de dicho proyecto.

Viabilidad económica:

El incremento del precio final que conlleva este nuevo servicio no sería desproporcionado y seguiría siendo competitivo. Además, con este servicio, se estaría revalorizando el biobanco dando salida a una gran masa de muestras estancadas y, hasta el momento, inservibles en investigación.