

# EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS PEQUEÑAS

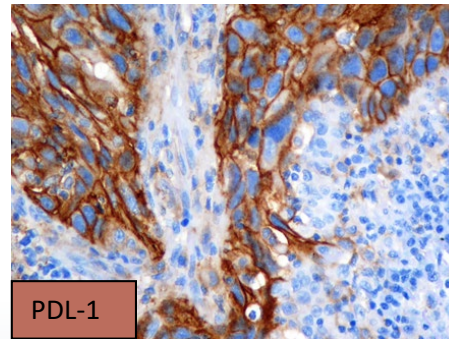
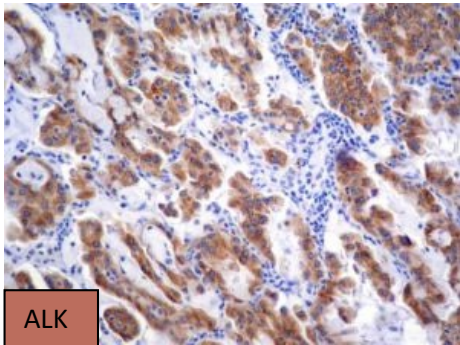


Debido al aumento de la inmunoterapia y de nuevas terapias moleculares dirigidas, cada vez tenemos que rentabilizar más la muestra que recibimos en el Servicio de Anatomía Patológica.

Son muestras muy pequeñas a las que les realizamos:

➡ Técnica de rutina: Hematoxilina-eosina

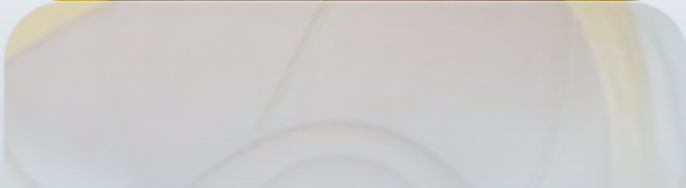
➡ Técnicas Inmunohistoquímicas: Biomarcadores con aplicación clínica



➡ Técnicas moleculares: EGFR y BRAF



El problema surge cuando el material al que tenemos que realizar el estudio molecular, lo recibimos así.....

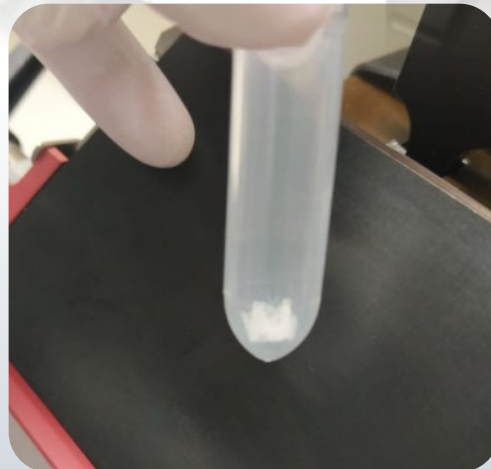
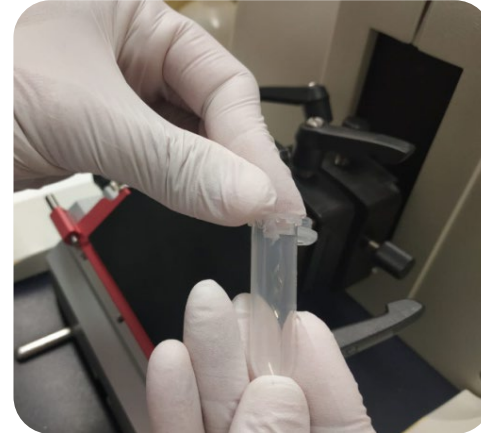
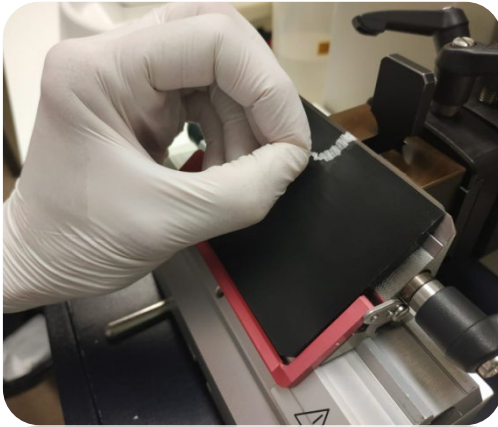


Recurrimos al protocolo de extracción de ADN PicoPure<sup>®</sup>, diseñado para tejidos pequeños, muestras seleccionadas con microdissección o pellet de células aisladas (unas 100 células aproximadamente).



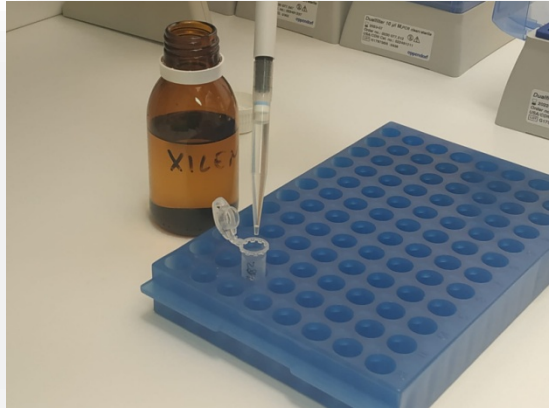
## PROTOCOLO DE MUESTRAS PEQUEÑAS FIJADAS EN FORMOL

Realizamos un corte o dos del tejido a 5 micras y lo introducimos en un tubo eppendorf

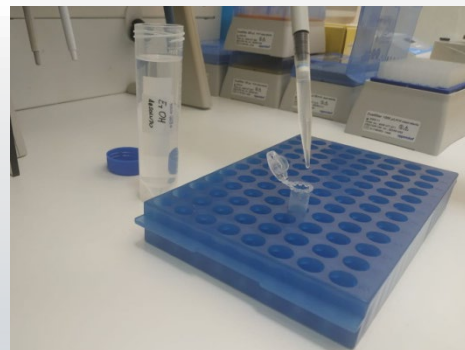


A continuación **DESPARAFINAMOS** la muestra:

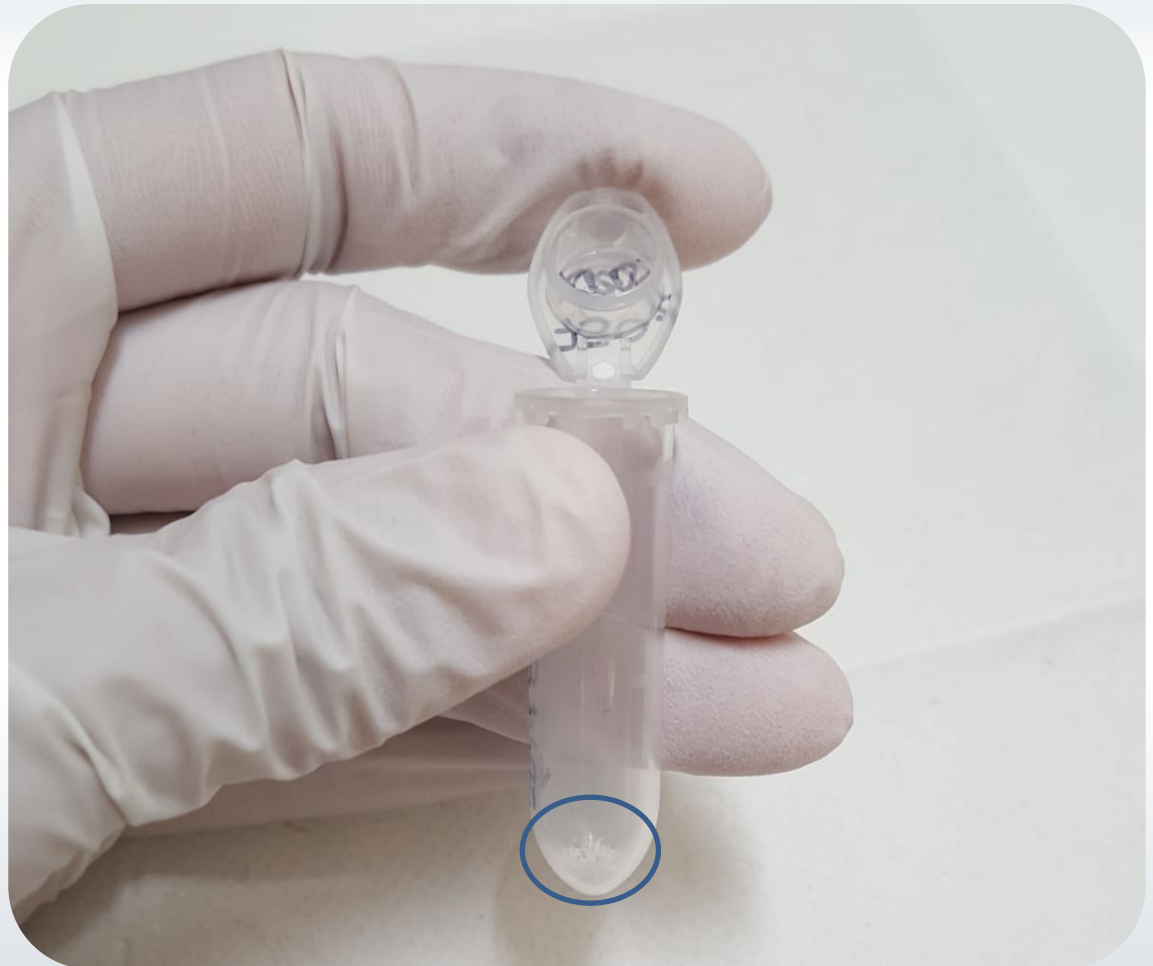
Realizamos dos lavados de xilol: añadimos al tubo ependorf con la muestra 1 ml de xilol, centrifugamos 5 minutos, quitamos el sobrenadante, y sobre el pellet, añadimos otro mililitro de xilol y volvemos a centrifugar otros 5 minutos.



Para eliminar el xilol y **DESHIDRATAR** la muestra, realizamos un lavado en alcohol, centrifugamos 5 minutos, quitamos el sobrenadante



Secamos el pellet resultante a 56°C hasta conseguir obtener una escama





A continuación realizamos una **DIGESTIÓN** con la enzima Proteinasa K a 65°C

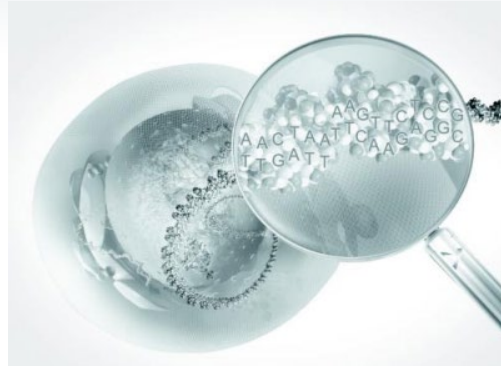
- Desde 3 horas en células en suspensión no fijadas
- Hasta más de 16 horas para tejido fijado en formol.



Tras la digestión desactivamos la enzima incubando la muestra a 95°C durante 10 minutos.



Ya tenemos el ADN listo para realizar el estudio mutacional de los oncogenes.



Para guardar, a -20°C

EGFR

BRAF

AQ Assay Setup Run Setup Run Analysis Report

Overview Analysis Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NRAS 12+13 19M691	NRAS 61 19M691	KRAS 59+61 19M691	KRAS 117 19M691	KRAS 146 19M691	NRAS 59 19M691	NRAS 117 19M691	NRAS 146 19M691
B	NRAS 12+13 19M691	NRAS 61 19M692	KRAS 59+61 19M692	KRAS 117 19M692	KRAS 146 19M692	NRAS 59 19M692	NRAS 117 19M692	NRAS 146 19M692
C	BRAF-V600Ecase 19M698	BRAF-V600Ecase 19M725	BRAF-V500Ecase CMUT	BRAF-V600Ecase CWT				

Analyze

Assay

Sample ID

Quality

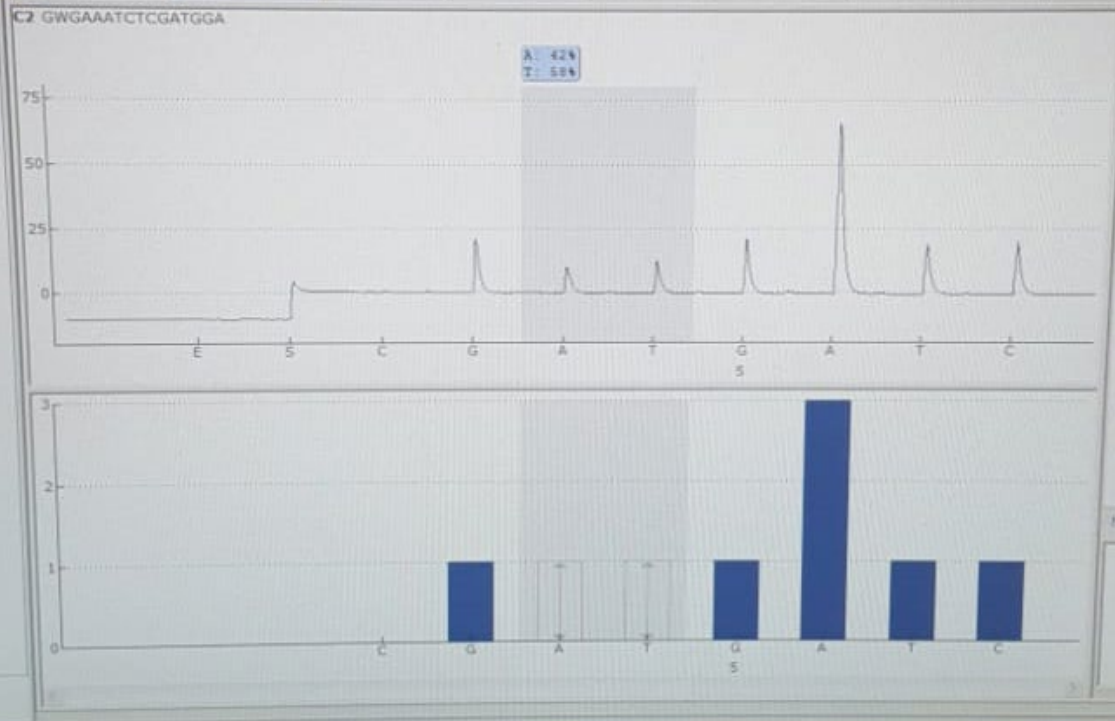
Well information

C2

Assay: BRAF-V600Ecase

Sample ID: 19M725

Note:



SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA  
Tel. 968 12 86 00 Ext. 951417 / 18

### Informe Anatomopatológico

67366791-B1

Biopsia Nº: SL19B0004057

Órgano: pulmón  
Intervención: BAG.

Datos clínicos: área de vidrio desdeshidratado que ha aumentado de tamaño en zonas sólidas. Descartar adenocarcinoma de lenta evolución.

#### Descripción macroscópica:

Se reciben múltiples fragmentos cilíndricos que miden menos de 0,1 cm de grosor con una longitud entre 0,3 cm y menos de 0,1 cm.  
SIST

#### Descripción microscópica:

##### DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO:

Mínimos cilindros de tejido pulmonar infiltrados por una neoplasia de aspecto glandular, TTM positiva.  
Hallazgos y perfil de ADENOCARCINOMA PULMONAR.  
Estudios mutacionales solicitados.

21/05/2019 10:09 PATÓLOGO (CARMEN LOPEZ PEÑA)

Análisis ALK: Negativo. Evaluación de la mutación de ALK por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview TM Roche. Anticuerpo ALK-ventana anti ALK (D5F3)

Análisis PDL-1: Negativo. Evaluación de la expresión de PDL-1 por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview TM Roche. Anticuerpo Ventana PDL-1 (SP263)

Análisis ROS-1: Negativo. Evaluación de la expresión de ROS-1 por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview DAB + amplificado. Anticuerpo Ventana ROS-1 (D4 D6) Rabbit Mab.

Recibido: 16/05/2019

Informado: 21/05/2019

Fdo. De/a: LOPEZ PEÑA, CARMEN  
De/a:

SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA  
Tel. 968 12 86 00 Ext. 951417 / 18

### Informe Estudio Molecular

68030367-M1

Nº Registro: SL19M0000748

Muestras: A B Cilindro de pulmón

Datos clínicos y motivo del estudio:

Datos Clínicos: FUMADOR ACTIVO ADENOCARCINOMA PULMONAR. CELULARIDAD TUMORAL 90%  
SIN INFLAMACION NI NECROSIS

Determinación: EGFR

#### ANÁLISIS MOLECULAR DE ESTUDIO MOLECULAR:

- EGFR:

RESULTADO: MUTACIÓN DETECTADA EXON 21 L858R. Esta mutación está relacionada con la sensibilidad a tratamiento con inhibidores de la actividad tirosinquinasa.

Celularidad tumoral: 90%

Nº lote del kit: E20209

Determinación en tejido paraafinado de las mutaciones frecuentes en exones 18, 19, 20 y 21 de EGFR mediante PCR a tiempo real empleando el kit EGFR Mutation Test v2 IVD (Ref: 07248563190) de Roche y el termociclador Cobas Z480 de Roche.

- BRAF Determinación del estado mutacional V600 en el gen BRAF:

Celularidad tumoral en el espécimen extraído: 90%

RESULTADO: MUTACIÓN NO DETECTADA

La determinación del estado mutacional del codón 600 del gen BRAF se ha realizado mediante pirosecuenciación en el equipo PyroMark Q24 de Qiagen siguiendo el protocolo descrito en Liu et al. Oral Oncology 62 (2016) 72-77.

Con este protocolo conseguimos que, **aún partiendo de una muestra de pequeño tamaño**, podamos obtener un resultado en todas las pruebas realizadas en el servicio de Anatomía Patológica y dar así a los oncólogos la información suficiente para que puedan decidir los posibles tratamientos de inmunoterapia o terapia molecular dirigida, de la que el paciente se pueda beneficiar



**HOSPITAL GE NERAL UNIVERSITARIO SANTA LUCÍA**  
**SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**  
**Informe Anatomopatológico**

**Historia N.º: SL19BDDHM057**  
**Paciente: BERNAL LOPEZ, FILGEMCO**  
**N.º de S. S. N.º: 20080224-L**  
**F. Nacimiento: 24/03/1954**  
**N.º de C. S. S. S. N.º: 03057**  
**Ethnic: G**

**Servicio: EAD / RADIOLOGÍA DIAGNÓSTICA**  
**Doctor: Hilarijo Poyado, Especialista**  
**Clinica:**

**Organ: pulmón**  
**Intervención: BAO**  
**Datos clínicos: área de vídeo de la tala que ha aumentado de tamaño en zona céntrica. Derivar al seno de la tala evolucion.**

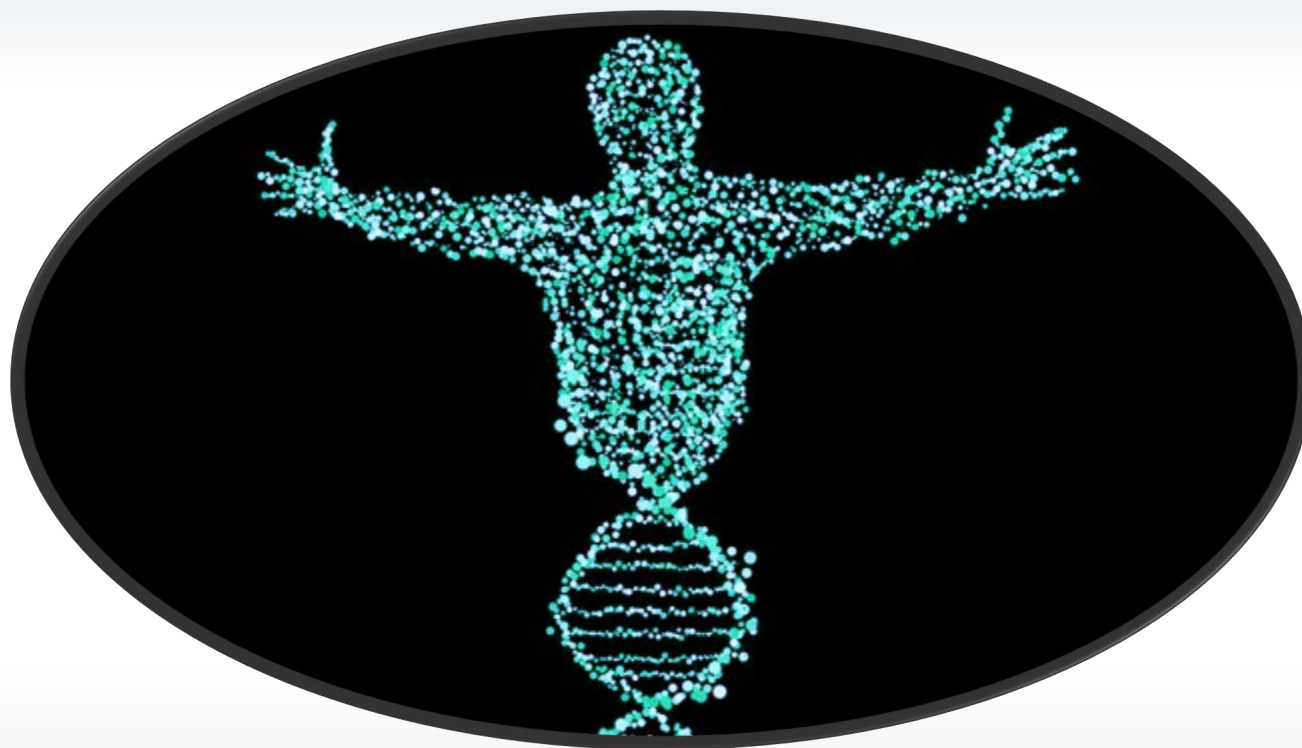
**Descripción macroscópica:**  
 Se reciben en el laboratorio fragmentos cilíndricos que miden entre de 0,1 cm de grosor con una longitud entre 0,3 cm y mayor de 0,1 cm.  
**SST**

**Descripción microscópica:**  
**DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLOGICO:**  
 Mucosa cilíndrica de tipo pulmonar infiltrado por una neoplasia de aspecto glandular, TIR: positiva.  
 Hábitus y perfil de ADENOCARCINOMA PULMONAR.  
 Estudios inmunohistoquímicos:  
 21/05/2019 10:00 PATÓLOGO (CARMEN LOPEZ PENA)  
 Análisis ALK. Negativo. Evaluación de la presencia de ALK por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview™ TM Roche. Anticuerpo ALK-entire anti ALK (D5F2).  
 Análisis PDL-1. Negativo. Evaluación de la expresión de PDL-1 por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview™ TM Roche. Anticuerpo Ventana PDL1 (SP263).  
 Análisis ROS-1. Negativo. Evaluación de la expresión de ROS-1 por inmunohistoquímica utilizando el Kit optiview™ DAB + amplificado. Anticuerpo Ventana ROS-1 (D4 D6) Rabbit MAAB.

**Resumen del equipo P**

**Fecha: 16/05/2019** **Informe: 21/05/2019** **Fdo. Dra. LOPEZ PENA, CARMEN**  
**Dña:**

\* Este informe debe elaborarse en el formato oficial de esta plantilla. Página: 1/1



**GRACIAS!!!**