

Você sabe o que é ddPCR?

Resumo: Saiba como a nova geração do PCR, a ddPCR, permite que tenhamos reações mais robustas, com mais resistência a inibidores e com quantificação absoluta.

A sigla ddPCR vem de Droplet Digital Polymerase Chain Reaction, conhecida em português como **PCR Digital em Gotas**, ou **ddPCR**.

O melhor de dois mundos

No final da década de 80, o bioquímico Kary Mullis, junto com seu colega Michael Smith, desenvolveu um método de replicar sequências de DNA, chamada Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction* ou PCR). A PCR tradicional utiliza a técnica chamada de *end-point*, ou seja, a análise é realizada em um gel de agarose após o término da reação de PCR. Assim, a análise é **qualitativa**, permitindo a detecção de presença ou ausência da sequência esperada. Ela, no entanto, não permite uma quantificação do número cópias da sequência-alvo na amostra.

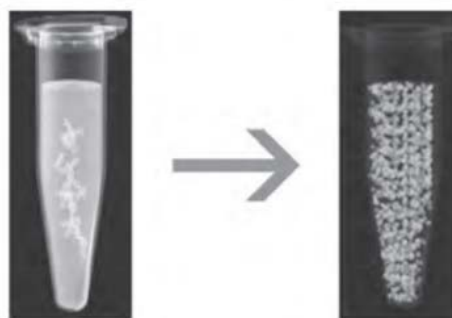
Passada a época de detectar ou não a presença de uma sequência, é então necessário avaliar sua quantidade, proporção ou concentração. Quanto deste medicamento diminui a expressão do gene X? Quantas vezes este gene sofreu mutação neste tumor? Qual é a carga viral neste paciente? Temos então a era do PCR em Tempo Real, ou qPCR. Ela permite a análise, via marcador fluorescente, à medida que cada ciclo da reação ocorre (por isso o nome de Tempo Real). A qPCR necessita portanto de controles (um grupo de referência ou uma curva padrão) para normalizar seu resultado. Temos dessa

forma o número de vezes em que uma sequência é mais expressa (ou menos) do que o controle e, com isso, uma quantificação só pode ser realizada na presença de um material de referência com concentrações do alvo conhecidas (curva padrão). Desta forma, a qPCR é uma técnica **semi-quantitativa**, já que não conta de forma absoluta as cópias amplificadas. Além disso, variações na eficiência da amplificação podem afetar a qualidade do resultado final.

Nas últimas décadas foi desenvolvido um método que possibilita a **quantificação absoluta**, resultando em uma contagem precisa do número de cópias do DNA/RNA em uma amostra. Desenvolve-se uma nova geração de PCR, a ddPCR. Ela, por sua vez, conta com a solidez de uma reação *end-point*, facilitando a detecção de eventos raros ricas em inibidores e, também, a sensibilidade da PCR em Tempo Real como base para uma **quantificação absoluta** com alta **sensibilidade** e **precisão**.

E como a ddPCR funciona?

A amostra a ser amplificada é particionada em 20.000 gotas juntamente com os reagentes inerentes a uma reação de PCR. Cada uma destas gotas abrigará uma reação de PCR independente; com isso,



Na ddPCR, a amostra é fracionada em até 20.000 gotas. Cada uma abriga uma reação de PCR independente.

são geradas 20.000 replicatas de uma reação *end-point*. Cada uma destas gotas é analisada por um sistema semelhante a um citômetro de fluxo, no qual se detectam gotas positivas (que tiveram amplificação da sequência-alvo) e/ou negativas.

Este fracionamento permite que eventos raros possam ser isolados daqueles com maior ocorrência além de favorecer a diminuição drástica do volume residual (prejudicial para a análise de eventos raros). Desse modo, sequências com baixa expressividade têm maior disponibilidade na reação. Além de tudo, o fracionamento também diminui a concentração de fatores inibitórios à PCR, resultando em uma reação **limpa, eficiente, precisa e contável**.

Quais são as aplicações da ddPCR?

A ddPCR pode ser aplicada a qualquer análise na qual a sequência-alvo é rara, ou que tenham considerável quantidade de inibidores, ou que o volume de amostra é escasso.

Somada à necessidade de alta precisão, à quantificação absoluta e ao isolamento do viés de eficiência de amplificação, a ddPCR é a solução ideal para uma alta precisão em amostras difíceis. Desta forma, a ddPCR pode ser aplicada nos seguintes casos:

- Quantificação absoluta;
- Alterações genômicas, como CNV (Copy Number Variation);
- Detecção de sequências raras;
- Biópsia líquida;
- Detecção de patógenos;
- Expressão gênica e análise de microRNA;
- Quantificação de bibliotecas para NGS (Next Generation Sequencing);
- Análises *single cell*;
- Detecção de edição de genoma;
- Monitoramento de solo e água;
- Análise de alimentos;
- E outros casos mais.

Essas e muitas outras aplicações podem ser desenvolvidas utilizando a tecnologia de ddPCR.

O que a medicina pode ganhar com esta tecnologia?

Um dos desafios ao estudar o perfil molecular de tumores é a sensibilidade limitada do qPCR. A detecção de mutações raras em amostras de **Biópsia Líquida** ou **Fixadas em Formalina e Incluídas em Parafina (FFPE)** necessita de numerosas replicatas para obter uma relevância biológica estatística. Isto pode gerar um aumento significativo no custo e tempo para condução dos ensaios. A ddPCR, por sua vez, é capaz de detectar sequências raras em um volume escasso de amostra, diminuindo tempo e/ou custo com aumento de sensibilidade e precisão.

A ddPCR também pode auxiliar a tecnologia de NGS na medicina personalizada. Embora o uso do NGS tenha se propagado, seu custo ainda é bem expressivo. Quando buscamos um mapeamento de mutações e/ou genes do tumor, o custo/gene se torna relativamente baixo por ser dividido por todos os genes. No entanto, em situações nas quais já sabemos quais genes serão os alvos (*i.e.* monitoramento de tratamento ou recidiva), seu custo/gene se torna consideravelmente alto, dado

que o custo da reação é dividido por poucos genes de interesse. Desta forma, o uso do ddPCR nos fornece uma alta precisão com um menor custo por gene.

#pcr #ddpcr #dna #genética #gene #PCRdigitalemgotas