

PLATAFORMAS BIOSENSORAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MIRNAS, BIOMARCADORES DE RELEVANCIA EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE CÁNCER

Descripción

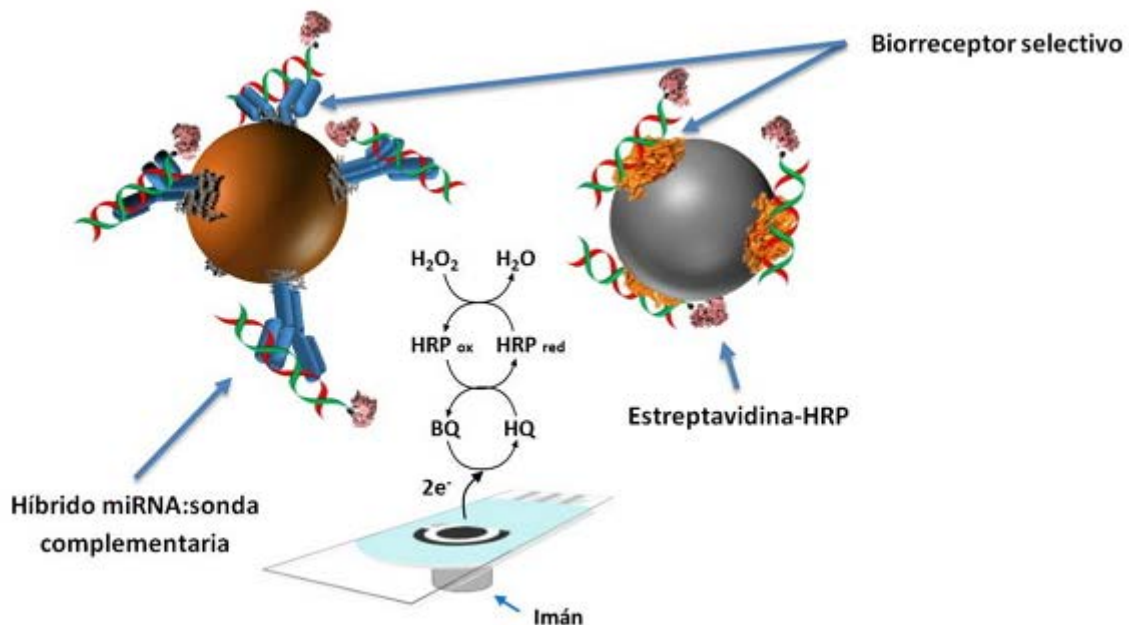
La tecnología propuesta permite la determinación fiable, selectiva y sensible de biomarcadores de diagnóstico precoz de cáncer (microRNAs, miRNAs o miRs) en RNA total (RNA_t) extraído de muestras clínicas complejas de una forma rápida, sencilla y sin necesidad de etapas adicionales de amplificación, mediante el empleo de biosensores amperométricos basados en soportes micromagnéticos funcionalizados con bioreceptores adecuados y electrodos serigrafados desechables.

En estos dispositivos de detección, la señal amperométrica obtenida, proporcional a la concentración del miRNA diana, se basa en las reacciones enzimáticas y electroquímicas implicadas en el sistema HRP/HQ/H₂O₂ que tienen lugar en la superficie del transductor electroquímico a un potencial constante apropiado.

Cómo funciona

La bioplataforma amperométrica desarrollada consiste en la hibridación selectiva del miRNA diana con una sonda complementaria sintética modificada con biotina, y posterior captura de los híbridos formados en disolución por biorreceptores de elevada selectividad, previamente inmovilizados de manera efectiva sobre partículas micromagnéticas comerciales funcionalizadas. Los híbridos capturados y aislados de la matriz de la muestra son marcados enzimáticamente con un polímero de estreptavidina-HRP en una última etapa a través de la interacción biotina-estreptavidina.

Los biosensores desarrollados se han aplicado satisfactoriamente a la determinación de diversos miRNAs maduros relevantes para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama (como el miRNA-21 y el miRNA-205) en RNA_t extraído de líneas celulares y de tejidos frescos, tejidos embebidos en parafina y citologías mamarias. El análisis solo requiere suplementar la cantidad adecuada de RNA_t con la sonda biotinilada específica. Dada la ausencia de efecto matriz en todas estas muestras el contenido de miRNA maduro en la muestra en estudio puede determinarse sencillamente por interpolación de la respuesta amperométrica obtenida con la bioplataforma en un calibrado realizado previamente con estándares de miRNA sintético.



Esquema de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas para la determinación de miRNAs.



Universidad Complutense de Madrid

Vicerrectorado de Transferencia del Conocimiento y Emprendimiento
Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI)

El tiempo necesario para la determinación abarca desde 75 a 120 minutos. No obstante, en caso necesario es posible reducir drásticamente este tiempo a tan sólo 15 minutos, sin una pérdida significativa de la sensibilidad del método.

Debido a la elevada homología existente entre secuencias de distintos miRNAs contenidos en una misma muestra, es esencial disponer de un método de análisis de este tipo de biomarcadores que presente una elevada selectividad. Las metodologías desarrolladas han demostrado una selectividad completa frente a miRNAs con secuencias no complementarias, y aceptable frente a miRNAs sintéticos con una única base desapareada, asegurando la obtención de resultados fiables y precisos. Su versatilidad las hace fácilmente trasladables a la determinación de cualquier miRNA y para el multiplexado de paneles de miRNAs que permitan la identificación de perfiles únicos de expresión de estos biomarcadores, a nivel tisular y celular, inherentes a cada tipo de cáncer y estadio de la enfermedad. De este modo, posibilitarían la clasificación y caracterización molecular de la misma y la aplicación del tratamiento más apropiado en cada caso.

Ventajas

Las principales ventajas de las metodologías desarrolladas son:

- Fácilmente **aplicables** a la detección de **cualquier miRNA** y otros RNAs de interés.
- Posibilidad de analizar miRNAs en RNA_t extraído de **cualquier tipo de muestra biológica**.
- Sencilla implementación en dispositivos de diagnóstico de tipo **point of care**.
- Instrumentación **sencilla** y de **bajo coste**.
- Sensibilidad adecuada para la detección directa de miRNAs **sin** necesidad de aplicar **etapas previas adicionales de transcripción reversa, amplificación y purificación**.
- Capacidad de **mutiplexado**.
- Tecnología fácilmente **automatizable**.
- **Tiempos y costes por ensayo inferiores** a los de la estrategia convencional de análisis de miRNAs por qRT-PCR.
- Proporcionan **resultados cuantitativos fiables**.
- **Eficiencia similar para el análisis de muestras de tejidos frescos y parafinados (FFPE)**.
- Posibilidad de realizar los ensayos a **T ambiente**.

¿Dónde se ha desarrollado?

Estas bioplataformas han sido desarrolladas en el [Grupo de Electroanálisis y \(Bio\)sensores Electroquímicos](#) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid liderado por el Prof. José Manuel Pingarrón y en colaboración con el Grupo de Farmacología Molecular del CIB-CSIC (Dr. José María Sánchez-Puelles) y la empresa CANNAN RESEARCH & INVESTMENT S.L. (D. Enrique Sáinz-Martínez).

Y además

La metodología ofertada ha sido aplicada con éxito a la detección individual y simultánea de dos miRNAs de gran relevancia en el diagnóstico de cáncer de mama: miRNA-21 y miRNA-205. Estas dianas presentan comportamientos y niveles de expresión opuestos en este tipo de cáncer (hiper-expresión o comportamiento como oncogén del miRNA-21 e hipo-expresión o comportamiento como supresor tumoral de miRNA-205).

En comparación con la estrategia convencional de determinación de miRNAs por qRT-PCR, las metodologías desarrolladas permiten realizar determinaciones absolutas de la concentración de miRNAs de manera mucho más sencilla, en menor tiempo y con mucho menor coste. Además estas bioplataformas no requieren etapas previas de transcripción reversa de RNA a DNA, de amplificación ni la necesidad de disponer de un estándar interno.

El buen funcionamiento y el alto grado de robustez demostrados por las estrategias propuestas permite su implementación como herramientas analíticas que proporcionen información adicional a las pruebas clínicas más comunes para el diagnóstico de cáncer de mama, basadas en ensayos semicuantitativos (inmunohistoquímica) de niveles de expresión de biomarcadores de naturaleza proteica.

Investigadores responsables

José Manuel Pingarrón Carrazón: pingarro@quim.ucm.es

Susana Campuzano Ruiz: susanacr@quim.ucm.es

Departamento: Química. Analítica

Facultad de CC. Químicas