

NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS PARA LA DETECCIÓN VISUAL DE BIOMARCADORES GENÉTICOS: miRNAs EN MASTITIS BOVINA

Adrián Sánchez-Visedo, Ana Soldado, María T. Fernández-Argüelles, José M. Costa-Fernández
 Grupo de Espectrometría Analítica y Bioanalítica (GEAB). Facultad de Química, Dpto. de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo. Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto el interés actual existente en la cuantificación de micro ARN (miRNA) en muestras biológicas. Los miRNAs son pequeños ARNs no codificantes, altamente conservados, monocatenarios y endógenos constituidos por aproximadamente 19-25 nucleótidos. La participación de los miRNA en diferentes procesos biológicos, tales como la expresión y regulación de proteínas [1,2], hacen que puedan considerarse como una clase emergente de biomarcadores, presentando una correlación entre la presencia de un determinado miRNA y condiciones patológicas, como enfermedades inflamatorias [3,4].

Existen diferentes métodos de detección/cuantificación de miRNAs, que incluyen transferencia (Northern blot), reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), microarrays, secuenciación, clonación e hibridación in situ, entre otros. Sin embargo, algunos de esos métodos sufren ciertos problemas prácticos cuando se pretende diseñar sistemas de análisis rápidos y sensibles, incluido que suelen ser técnicas que requieren largos tiempos de análisis, con frecuencia requieren de grandes volúmenes de muestra y múltiples pasos experimentales. Además, muchas veces la sensibilidad no es lo suficientemente buena para asegurar la detección de miRNA a niveles de concentración relevantes, puesto que los miRNAs que deben detectarse para un diagnóstico rápido se encuentran normalmente en niveles de concentración muy bajos [5]. Los métodos más sensibles y específicos, basados en herramientas de hibridación como la secuenciación, la clonación, la hibridación "in situ" y los métodos basados en la amplificación como la qRT-PCR requieren un diseño de cebadores delicado y laborioso debido a la corta longitud de los miRNAs, así como una preparación compleja de la muestra que implica múltiples pasos experimentales, incluida la modificación de los miRNAs, lo que requiere personal altamente cualificado para realizar tanto el trabajo experimental como el análisis de datos [6], y resulta en un mayor costo y complejidad.

En este sentido, las metodologías colorimétricas basadas en el empleo de nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs) constituyen una alternativa muy conveniente para la detección de miRNAs de forma

rápida, simple y rentable. Así, recientemente, se han diseñado algunos ensayos colorimétricos para la detección de miRNAs basados en el uso de AuNPs. La mayoría de las metodologías descritas hasta ahora requieren largos tiempos de análisis e incluyen pasos de amplificación basados en el uso de enzimas [7].

Sobre la base de estas técnicas, en nuestro grupo de investigación de espectrometría analítica y bioanalítica de la Universidad de Oviedo hemos trabajado en el diseño, optimización y evaluación de ensayos para la detección de miRNAs a simple vista, que aprovecha los cambios de la absorción de resonancia del plasmón superficial. Estos cambios se producen cuando las AuNPs se agregan en presencia de la molécula diana (ver Figura 1) [8]. Para asegurar la selectividad, las AuNPs se modifican con secuencias de ARN cortas que son complementarias a la secuencia del miRNA de interés [9]. Esta estrategia proporciona un método rápido, simple, rentable y altamente sensible para la detección de miRNA, evitando el diseño de plantillas sofisticadas, y donde la lectura se puede realizar a simple vista, sin la necesidad de una instrumentación compleja y costosa.

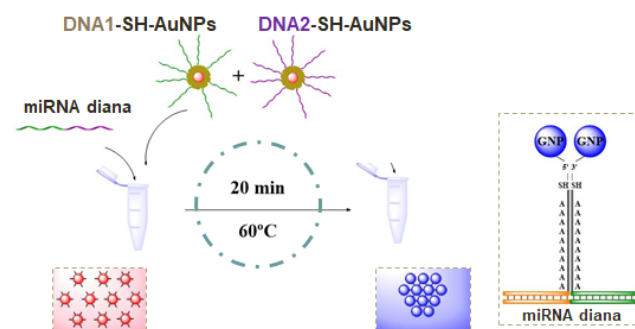


Figura 1. Principio de detección visual de los miRNAs

Como prueba de concepto, hemos trabajado en el diseño de un sistema de detección visual de miRNAs biomarcadores de mastitis bovina, un problema de gran interés en la industria láctea. La mastitis bovina es una reacción inflamatoria persistente del tejido de la ubre causada por una amplia gama de infecciones por microorganismos [10]. Es una enfermedad muy prevalente y costosa para el ganado lechero, que genera

grandes pérdidas económicas para la industria lechera. El recuento de células somáticas y el cultivo bacteriológico de muestras de leche son los métodos de diagnóstico más utilizados para la mastitis bovina [11]. Sin embargo, presentan limitaciones como la variabilidad en la interpretación de los resultados entre diferentes técnicos, altas tasas de falsos positivos debido a condiciones ambientales, la temporada o el estrés de los animales, así como altos tiempos de obtención de resultados de entre 48 y 72 horas, presentando una baja sensibilidad [12].

Con el fin de garantizar una alta eficiencia en el control de la seguridad agroalimentaria, la industria y los productores lácteos se beneficiarían de contar con métodos de análisis fiables y rápidos capaces de detectar biomarcadores de tuberculosis y mastitis “in situ” y de forma rápida para lograr un diagnóstico rápido de la enfermedad.

Existen distintas familias de miRNA que están involucradas en la enfermedades como la mastitis, tanto en muestras de leche como en tejidos bovinos [13]. En este trabajo hemos seleccionado, como biomarcador de mastitis, el miR146a. Este miRNA ha sido descrito como uno de los principales miRNAs involucrados en la respuesta inmune de la mastitis bovina, expresándose en muestras de tejido, sangre y leche [14,15], así como en otras enfermedades como la tuberculosis [16].

Diseño Experimental del sistema Sensor

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, hemos llevado a cabo la puesta a punto de un ensayo para la detección de miRNAs a simple vista que aproveche el cambio de color que se observa como consecuencia de la agregación de AuNPs en presencia del biomarcador, miR146a en este caso.

Dos alícuotas distintas de AuNPs de tamaño inferior a 20 nm (que presentan coloración roja cuando están dispersas en medio acuoso) se modifican con secuencias de ADN cortas complementarias a la secuencia del miR146a. La visualización de la diferencia de color se llevó a cabo colocando las muestras en una placa de cromatografía de capa fina (TLC) de sílice C18, conservando el color de la mezcla y evitando la disociación de los agregados formados, lo que permite un registro permanente de la prueba, donde la apreciación de la agregación se pueda realizar a simple vista (aparece coloración azul).

Funcionalización y Caracterización de las AuNPs

En primer lugar, es preciso llevar a cabo la selección de las condiciones experimentales del ensayo para realizar

una detección visual del miRNA. El ensayo se basa en la observación de cambios de color de una muestra acuosa que contiene AuNPs en presencia y ausencia del analito diana. Para este propósito, es preciso modificar la superficie de las AuNPs (sintetizadas en el laboratorio o comerciales) con hebras de ADN adecuadas al analito a determinar. Una estrategia en este sentido sencilla y rápida es el empleo de hebras tioladas en uno de los extremos. La alta afinidad del S por el Au hace que eficazmente la superficie de las AuNPs pueda rodearse del material genético.

En este tipo de ensayos es preciso preparar dos conjuntos de AuNPs (los denominaremos SET 1 y SET 2), cada una de ellas con dos secuencias de ADN diferentes con una modificación de 5'-tiol y una modificación de 3'-tiol. Ambas secuencias son parcialmente complementarias al biomarcador diana (en el caso de la mastitis, el miR146a).

Una vez preparadas las hebras de material genético funcionalizadas con las AuNPs, el procedimiento de análisis es relativamente sencillo: se basa en la mezcla de volúmenes apropiados de los dos materiales preparados (SET 1 y SET 2) de AuNPs con la muestra que contiene el miRNA objeto de análisis. Después de un tiempo de incubación (tiempos inferiores a 20 minutos suelen ser suficiente) a temperatura controlada (normalmente 50°C), una porción del analito objetivo se hibridará con la hebra complementaria del brazo sensor del SET 1, y la otra parte hará lo mismo con la hebra del brazo sensor del SET 2. Por lo tanto, debido a esta hibridación, las AuNPs se acercarán entre sí y se producirá un cambio en el color de rojo a morado/negro (ver ejemplo de la Figura 2).

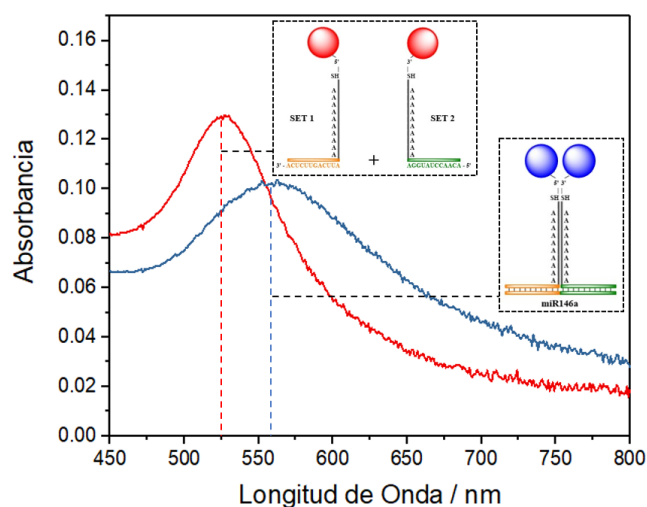


Figura 2. Espectros de absorbancia de las AuNPs antes y después de la adición del miR146a

La medición del desplazamiento espectroscópico UV / Vis de la longitud de onda del pico de resonancia del plasmón de la superficie de las AuNPs empleando un espectrómetro VIS-UV resulta útil para optimizar las condiciones de ensayo.

Detección visual de los miRNAs

La metodología antes presentada permite además el desarrollo de sensores de un solo uso (basados en la percepción del cambio de color causado por la agregación de las AuNP, observado en presencia del miRNA objeto de estudio) cuando el proceso se lleva a cabo sobre la superficie de un material adecuado (p.ej. sobre una placa de cromatografía de capa fina, TLC).

A modo de ejemplo, la Figura 3 muestra el resultado del análisis de diferentes muestras de leche de vaca, enriquecidas con distintas cantidades de miR146a, obtenidas en el Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA). Así, se seleccionaron 9 muestras de leche procedente de otras tantas vacas sanas a las que se les añadieron diferentes cantidades de miR146a. La mayoría del miRNA presente en las muestras de leche se encuentra en el sedimento obtenido después de la centrifugación de la muestra. Por tanto, es preciso centrifugar las muestras de leche, separando las diferentes fases y descartando la parte superior (grasa) y la intermedia (suero). Para el caso concreto de este tipo de muestras lácteas, antes de efectuar el análisis es preciso llevar a cabo una extracción del RNA, lo cual puede llevarse a cabo empleando un sencillo kit comercial.

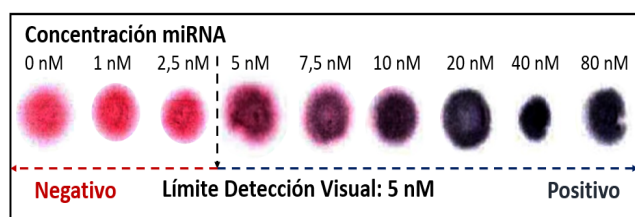


Figura 3. Manchas en la placa de TLC obtenidas para el complejo AuNPs-miR146a tras llevar a cabo el análisis de muestras de leche enriquecidas con miR146a a las concentraciones indicadas en la figura.

Como se observa en la Figura 3, la sensibilidad alcanzada con una detección visual del cambio de color permite asegurar la presencia de miR146a cuando se encuentra presente en las leches a niveles de concentración superiores a 5 nM. Es preciso indicar que este tipo de sistemas permiten obtener una muy buena

repetibilidad a pesar de que la detección se hace de forma directa visual sin emplear ningún detector instrumental.

Consideraciones finales

La aproximación descrita en este artículo, abre nuevas vías para el desarrollo de dispositivos de detección visual para una amplia variedad de aplicaciones, ya que se puede adaptar fácilmente a la detección de otros biomarcadores genéticos, simplemente modificando las AuNPs con diferentes oligómeros apropiados y complementarios al biomarcador deseado.

Este tipo de ensayos son relativamente rápidos (el ensayo descrito tiene lugar en tan solo 20 min en condiciones isotérmicas suaves) y presentan una elevada selectividad. Además, es posible realizar la detección visual del analito sin la necesidad de instrumentación, y la lectura puede ser fácilmente interpretada por personal no cualificado, ya que solo es necesario poder observar un cambio en el color. Ambos aspectos son importantes ventajas para una posible implementación del método en el campo.

Las imágenes de las placas de TLC pueden tratarse empleando un escáner digital para minimizar el sesgo derivado de las diferencias en la percepción del color debido a la luz del ambiente. La tecnología de los teléfonos inteligentes es especialmente adecuada para registrar la imagen con una elevada calidad, y la incorporación de un software apropiado controlado a través de una aplicación para analizar el color, lo que permitiría obtener datos cuantitativos, ya que el grado de agregación se puede relacionar a la concentración de microARN.

Actualmente nos encontramos trabajando en el diseño de estrategias de amplificación de la señal analítica (en este caso el grado de agregación de las AuNPs dando lugar a cambios más intensos de color en presencia de cantidades menores de miRNAs), buscando así disminuir los límites de detección del ensayo. Para ello existen varias estrategias que presentan un gran potencial en este sentido. En el grupo de investigación estamos empleando, con este objetivo, un tipo estructuras conocidas como MNazymes, observándose una importante amplificación de la señal analítica que se traduce en una mejora sustancial en los límites de detección. Se espera pues un importante grado de desarrollo de este tipo de metodologías en un futuro próximo.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida por parte del Principado de Asturias (FCGRUPIN-IDI/2018/000166 y GRUPIN-IDI/2018/000237), al Ministerio de Economía y Competitividad de España (Proyectos CTQ2016-79412-P y PID2019-109698GB-I00) y al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria Nacional de Investigaciones Agrarias (Proyecto RTA2015-00061/AEI/FEDER), cofinanciado con fondos FEDER de la Unión Europea.

Bibliografía

- [1] L. He, X. He, L.P. Lim, E. De Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A.L. Jackson, P.S. Linsley, C. Chen, S.W. Lowe, M.A. Cleary, G.J. Hannon, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, *Nature*. 447 (2007) 1130–1134. doi:10.1038/nature05939.
- [2] B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*. 120 (2005) 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
- [3] Z. Li, H. Zhang, N. Song, H. Wang, L. Chen, M. Zhai, X. Liu, Molecular cloning, characterization and expression of miR-15a-3p and miR-15b-3p in dairy cattle, *Mol. Cell. Probes*. 28 (2014) 255–258. doi:10.1016/j.mcp.2014.06.003.
- [4] M. De Planell-Saguer, M.C. Rodicio, Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review, *Anal. Chim. Acta*. 699 (2011) 134–152. doi:10.1016/j.aca.2011.05.025.
- [5] G.S. Pall, C. Codony-Servat, J. Byrne, L. Ritchie, A. Hamilton, Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot, *Nucleic Acids Res*. 35 (2007). doi:10.1093/nar/gkm112.
- [6] S.K. Wyman, R.K. Parkin, P.S. Mitchell, B.R. Fritz, K. O'Briant, A.K. Godwin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, M. Tewari, Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries, *PLoS One*. 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0005311.
- [7] R.D. Li, B.C. Yin, B.C. Ye, Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification, *Biosens. Bioelectron*. 86 (2016) 1011–1016. doi:10.1016/j.bios.2016.07.042.
- [8] R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, R.L. Letsinger, C.A. Mirkin, Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles, *Science* (80-.). 277 (1997) 1078–1081. doi:10.1126/science.277.5329.1078.
- [9] C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff, A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*. 382 (1996) 607–609. doi:10.1038/382607a0.
- [10] W. Yang, H. Zerbe, W. Petzl, R.M. Brunner, J. Günther, C. Draing, S. von Aulock, H.J. Schuberth, H.M. Seyfert, Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder, *Mol. Immunol*. 45 (2008) 1385–1397. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.004.
- [11] T.J.G.M. Lam, R.G.M. Olde Riekerink, O.C. Sampimon, H. Smith, Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach, *Ir. Vet. J*. 62 (2009) 34–39. doi:10.1186/2046-0481-62-S4-S34.
- [12] P.R.F. Adkins, Methods for Diagnosing Mastitis Bovine Mastitis Intramammary infection Diagnosis, *Vet. Clin. NA Food Anim. Pract*. 34 (2018) 479–491. doi:10.1016/j.cvfa.2018.07.003.
- [13] Z.M. Luoreng, X.P. Wang, C.G. Mei, L. Sen Zan, Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Int. J. Biol. Sci*. 14 (2018) 87–99. doi:10.7150/ijbs.22498.
- [14] M.R. Paterson, A.J. Kriegel, MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots, *Physiol. Genomics*. 49 (2017) 243–252. doi:10.1152/physiolgenomics.00133.2016.
- [15] Y.C. Lai, T. Fujikawa, T. Maemura, T. Ando, G. Kitahara, Y. Endo, O. Yamato, M. Koiwa, C. Kubota, N. Miura, Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis, *PLoS One*. 12 (2017) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0177182.
- [16] M. Iannaccone, G. Cosenza, A. Pauciullo, F. Garofalo, Y.T. Proroga, F. Capuano, R. Capparelli, Milk microRNA-146a as a potential biomarker in bovine tuberculosis, *J. Dairy Res*. 85 (2018) 178–180. doi:10.1017/S0022029918000122.