

La detección selectiva y sensible de variaciones de nucleótido único es fundamental para el diagnóstico precoz, la terapia individualizada y el pronóstico de enfermedades. Algunas de estas mutaciones puntuales están implicadas en el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y en el desarrollo de diversos tipos de cáncer. La pandemia SARS-CoV-2 ha puesto de manifiesto la necesidad acuciante de desarrollar métodos de detección fiables, rápidos y sencillos para el diagnóstico masivo. Asimismo, existe una demanda creciente de biosensores genómicos que sean selectivos, multianalito y de bajo coste y permitan detectar e identificar ciertos biomarcadores oncológicos.

La presente tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo de sistemas integrados de amplificación isoterma, hibridación selectiva y biosensado óptico para la detección de mutaciones puntuales en los genes *PIK3CA*, *KRAS* y *BRAF* asociadas al cáncer colorectal. Estos biomarcadores predictivos se relacionan con un incremento de la proliferación celular, apoptosis y resistencia a tratamientos con anticuerpos monoclonales (Cetuximab y Panitumumab). En concreto, las mutaciones del gen *KRAS* tienen una prevalencia del 40-50%, mientras que las mutaciones en los genes *PIK3CA* y *BRAF* presentan una prevalencia del 18 y del 5%, respectivamente.

Desde el punto de vista analítico, se ha abordado la correcta discriminación de estas mutaciones puntuales, lo cual supone un gran reto debido a la heterogeneidad de la muestra y a la reducida proporción de ADN mutante con respecto al ADN nativo. De hecho, existen pocas técnicas capaces de lograr la detección de mutaciones puntuales, destacando la secuenciación y la PCR a tiempo real. Sin embargo, nos encontramos ante el desafío científico-técnico de desarrollar nuevos métodos que presenten mejores prestaciones como una elevada selectividad, sensibilidad, respuesta rápida y, especialmente, que no requieran infraestructuras complejas.

En este contexto, se han explorado los métodos isotermos de amplificación de ADN, dado que son particularmente adecuados para el desarrollo de una nueva generación de dispositivos de diagnóstico dirigidos a apoyar la medicina de precisión. En concreto, se ha seleccionado la amplificación isoterma por recombinasa-polimerasa

(RPA) como una alternativa a los métodos de detección que requieren de infraestructuras singulares, así como de personal cualificado. Además, se ha investigado su integración con plataformas bioanalíticas, lo que supone un gran avance para la simplificación de los procesos de biorreconocimiento y su detección óptica. Esta metodología ha presentado ventajas frente a otros sistemas de detección de ADN, en términos de portabilidad y equipos, así como reducción de tiempos de ensayo y la posibilidad de realizar las pruebas de diagnóstico fuera del laboratorio.

La presente tesis doctoral, enmarcada en este contexto, se estructura en los siguientes capítulos.

En el **capítulo 1** se presenta una nueva variante de la amplificación por recombinasa-polimerasa, denominada RPA-bloqueada. Su mecanismo se basa en el enriquecimiento de alelos minoritarios mediante de la introducción de un agente bloqueante en la amplificación isoterma de la RPA. La adición de este oligonucleótido, complementario a la secuencia nativa, hace que se forme un complejo más estable con la variante nativa que con la variante mutante, controlando el proceso de elongación de modo más selectivo. Con este método, se ha conseguido superar el reto de amplificar selectivamente los alelos minoritarios en muestras reales donde existe una baja concentración de ADN tumoral, a temperatura constante (37 °C) y sin la necesidad de emplear equipos sofisticados.

Además, en esta investigación se ha desarrollado un soporte analítico formado por un chip de policarbonato con sondas alelo-específicas ancladas covalentemente, con el objetivo de detectar selectivamente el producto post-amplificado, procedente de RPA-bloqueada, mediante un ensayo de hibridación. En concreto, este tipo de plataformas bioanalíticas resultan altamente interesantes, puesto que poseen propiedades superficiales y ópticas óptimas para la fabricación de biosensores y para aplicaciones microfluídicas. La integración del método ha permitido desarrollar un sistema portátil para el genotipado simultáneo de mutaciones en los exones 9 y 20 del gen *PIK3CA* en líneas celulares y en tejidos tumorales de pacientes oncológicos.

En el **capítulo 2**, se describe el desarrollo de un genosensor que incorpora partículas magnéticas conjugadas a sondas alelo-específicas para la concentración y detección del producto de amplificación selectivo derivado de la RPA-bloqueada. Con este genosensor, de formato homogéneo, se han reducido los tiempos de hibridación y los volúmenes de reacción, así como interacciones inespecíficas, sin disminuir la sensibilidad alcanzada en el formato heterogéneo. Para mejorar la automatización, el ensayo se ha integrado en chips termoplásticos transparentes de cicloolefina con canales microfluídicos, mientras que las partículas magnéticas se han controlado con una plataforma de imanes permanentes construida mediante impresión 3D. Esta aproximación se ha concretado en un sistema portátil y de bajo coste para el genotipado del gen *KRAS* (codón 12), aplicable a muestras de tumores procedentes de tejido parafinado.

Los **capítulos 3 y 4** se centran en el desarrollo de superficies termoplásticas para el anclaje covalente de sondas alelo-específicas mediado por nanomateriales, con el objetivo de incrementar la densidad de inmovilización y por ende la sensibilidad del sistema. Así, se ha estudiado el anclaje covalente a superficies termoplásticas de policarbonato y cicloolefina activadas a sondas alelo-específicas mediado por dendrímeros carboxílicos mediante la química de la carbodiimida y por dendrones mediante la reacción quimioselectiva del grupo tiol-ino.

En estos capítulos, se ha demostrado que las plataformas termoplásticas 3D con híbridos ADN/dendrímero y ADN/dendrón presentan mejores prestaciones analíticas que los sistemas lineales, debido al gran número de sitios de unión por unidad de superficie, la gran flexibilidad de las ramas que conforman su estructura, la reducción de impedimentos estéricos y la distancia superficie-sonda. La combinación del método de amplificación isoterma de la RPA-bloqueada con la hibridación llevada a cabo en las plataformas bioanalíticas desarrolladas ha permitido crear un genosensor efectivo y multiplexado para el genotipado del codón V600 del gen *BRAF* y el codón H1047 del gen *PIK3CA*, en muestras de tejido biopsiado. Trabajando en condiciones restrictivas, se ha logrado una hibridación alelo selectiva puesta de manifiesto mediante detección colorimétrica, obteniendo un perfil molecular característico que permite su clasificación

en el correspondiente grupo poblacional. Los resultados obtenidos concuerdan con los del método de secuenciación masiva que es el de referencia.

Las investigaciones desarrolladas en la presente tesis han dado lugar a nuevas aportaciones metodológicas de interés basadas en la obtención de sistemas biosensores integrados. Estas plataformas, junto con los rápidos avances en el campo de la tecnología digital y la “salud móvil”, contribuirán al desarrollo de herramientas de diagnóstico masivo, cumpliendo con las características establecidas por la OMS para sistemas ASSURED (sensibles, específicos, fáciles de usar, rápidos y robustos, sin equipos, con conectividad a tiempo real, de fácil muestreo y disponibles para los usuarios finales). Estos sistemas permiten abordar prioridades como el control de enfermedades, fortalecer la eficiencia de los sistemas de atención médica y pueden dar respuesta a la demanda de genosensores de diagnóstico masivo.