

RESUMEN

La medicina actual se dirige hacia un enfoque más personalizado basándose en el diagnóstico molecular del paciente a través del estudio de biomarcadores específicos. Aplicando este principio molecular, el diagnóstico, pronóstico y selección de la terapia se apoyan en la identificación de variaciones específicas del genoma humano, como variaciones de un único nucleótido (SNV). Para detectar estos biomarcadores se dispone de una amplia oferta de tecnologías. Sin embargo, muchos de los métodos en uso presentan limitaciones como un elevado coste, complejidad, tiempos de análisis largos o requieren de personal y equipamiento especializado, lo que imposibilita su incorporación masiva en la mayoría de los sistemas sanitarios. Por tanto, existe la necesidad de investigar y desarrollar soluciones analíticas que aporten información sobre las variantes genéticas y que se puedan implementar en diferentes escenarios del ámbito de la salud con prestaciones competitivas y económicamente viables.

El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar estrategias innovadoras para resolver el reto de la detección múltiple de variantes genéticas que se encuentran en forma minoritaria en muestras biológicas de pacientes, cubriendo las demandas asociadas al entorno clínico. Las tareas de investigación se centraron en la combinación de reacciones de discriminación alélica con amplificación selectiva de DNA y el desarrollo de sistemas ópticos de detección versátiles.

Con el fin de atender el amplio abanico de necesidades, en el primer capítulo, se presentan resultados que mejoran las prestaciones analíticas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la incorporación de una etapa al termociclado y de un agente bloqueante amplificando selectivamente las variantes minoritarias que fueron monitorizadas mediante fluorescencia a tiempo real. En el segundo capítulo, se logró la discriminación alélica combinando la ligación de oligonucleótidos con la amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA), que al operar a temperatura constante permitió una detección tipo *point-of-care* (POC). La identificación de SNV se llevó a cabo mediante hibridación en formato micromatriz, utilizando la tecnología Blu-Ray como plataforma de ensayo y detección. En el tercer capítulo, se integró la RPA con la reacción de hibridación alelo específica en cadena (AS-HCR), en formato array para genotipar SNV a partir de DNA genómico en un chip. La lectura de los resultados se realizó mediante un smartphone. En el último capítulo, se presenta la síntesis de un nuevo reactivo bioluminiscente que se aplicó a la monitorización de biomarcadores de DNA a tiempo real y final de la RPA basada en la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), eliminando la necesidad de una fuente de excitación.

Todas las estrategias permitieron un reconocimiento específico de la variante de interés, incluso en muestras que contenían tan solo 20 copias de DNA genómico diana. Se consiguieron resultados sensibles (límite de detección 0.5% variante/total), reproducibles (desviación estándar relativa < 19%), de manera sencilla (3 etapas o menos), rápida (tiempos cortos de 30-200 min) y permitiendo el análisis simultáneo de varios genes. Como prueba de concepto, estas estrategias se aplicaron a la detección e identificación en muestras clínicas de biomarcadores asociados a cáncer colorrectal y enfermedades cardiológicas. Los resultados se validaron por comparación con métodos de referencia (NGS y PCR), comprobándose que se mejoraban los requerimientos técnicos y la relación coste-eficacia. En conclusión, las investigaciones llevadas a cabo posibilitaron desarrollar herramientas de genotipado con propiedades analíticas competitivas y versátiles, aplicables a diferentes escenarios sanitarios, desde hospitales a entornos con pocos recursos. Estos resultados son prometedores al dar respuesta a la demanda de tecnologías alternativas para el diagnóstico molecular y permitir avanzar en el seguimiento de enfermedades y tratamiento médico personalizado.