



Universidad de la República - CSIC

Formulario de Informe final del Programa de Apoyo
a la Investigación Estudiantil
Edición 2014



DATOS DEL PROYECTO

Título del Proyecto: Investigación y desarrollo de un inmunosensor para el aislamiento y cuantificación de exosomas en sobrenadante de cultivos celulares.

- Número ID del proyecto: ID 68
- Área de conocimiento: Biotecnología
- Facultad o Servicio: Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
- Nombre completo de los-as Integrantes del equipo:
-María Ximena Doldán Cabreira
-Pablo Martín Fagundez Ferron
-Romina Mazzuco Ortiz
- Correo electrónico del/de la estudiante referente: pablymff@gmail.com
- Nombre completo del/de la docente orientador-a: Juan Pablo Tosar Rovira
- Correo electrónico del/de la docente orientador-a: jptosar@pasteur.edu.uy

INFORME FINAL

1. Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada

El objetivo general es desarrollar un inmunosensor de base electroquímica para la purificación y cuantificación de exosomas en cultivos celulares.

Los objetivos específicos son:

- Construcción del biosensor que implica la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie de los electrodos modificados.
- Optimización del biosensor como instrumento de purificación: puesta a punto de las condiciones de incubación para una eficiente captura de exosomas.
- Optimización del sistema de detección electroquímico

2. Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.

2.1 Construcción del Biosensor:

- I. Modificación de la superficie del electrodo de trabajo mediante la formación de una monocapa autoensablada (SAMs)

Se utilizaron los electrodos adquiridos en Dropsens, en los cuales se modificó la superficie del electrodo de trabajo mediante una monocapa autoensablada (SAM) de ácido mercaptoundecanoico (MUA). La verificación de la inmovilización se realizó mediante voltamperometría cíclica (VC) empleando la pareja redox Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻, analizando los picos de oxidación/reducción de la misma sobre la superficie de los electrodos. Se realizó VC tanto en electrodos modificados con MUA y sin MUA. También se evaluó la modificación mediante la inmovilización de anticuerpos anti-IgG conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) en la superficie del electrodo modificado con la matriz autoensablada. Los anticuerpos se inmovilizaron covalentemente a la SAM a través de sus residuos básicos (típicamente lisina), formando un enlace amida con el extremo carboxílico de la SAM; cabe aclarar que esta unión covalente es una de las ventajas del método de inmovilización. Luego mediante la adición de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-peróxido (TMB-H₂O₂), se generó enzimáticamente el producto coloreado TMB-Oxidado y se registró la corriente de reducción de dicho producto.

- II. Inmovilización de Anticuerpos anti-CD9 y anti-TSG101 para la captura de exosomas.

Los exosomas presentan en su superficie proteínas específicas como por ejemplo CD9, por lo tanto se inmovilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD9 en la superficie modificada del electrodo de trabajo (MUA-CD9) y como control negativo se utilizó anti-TSG101 (proteína intraluminal de los exosomas, y no expuesta en su superficie). Se estudió la concentración de anticuerpos a utilizar mediante el agregado de un anticuerpo secundario (anti-IgG ratón) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), registrando la corriente de reducción del TMB-oxidado (producto generado por el agregado de TMB-H₂O₂).

- III. Bloqueo de la superficie del electrodo y/o SAM para evitar la unión inespecífica de exosomas.

Se utilizó el agregado del agente bloqueante PBS-BSA, en este punto también se evaluó la concentración del agente bloqueante a utilizar así como los tiempos y la temperatura de incubación. En todos los casos, se monitoreó el efecto producido por el agente bloqueante sobre la señal de reducción del TMB oxidado, según el método antes descrito. Se utilizó como control negativo electrodos sin agente bloqueante y

electrodos que fueron bloqueados previamente a la inmovilización del anticuerpo (no observándose señal, tal como era de esperar).

2.2 Optimización de la captura de los exosomas y puesta a punto los métodos electroquímicos utilizados para la detección.

Se obtuvieron muestras de exosomas, debidamente purificados de medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. La obtención y caracterización de estas muestras fue realizada por el docente orientador, y en colaboración con el Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto Pasteur de Montevideo. En primer lugar se incubó una muestra de exosomas sobre electrodos serigrafiados de oro modificados con MUA/anti-CD9 y se buscó la concentración óptima de anticuerpos que maximice la unión, evidenciado mediante el agregado de un anticuerpo secundario anti-IgG ratón conjugado a HRP, y registrando la corriente de reducción del producto oxidado producido por el agregado de TMB. Paralelamente, los ensayos se realizaron con muestras de microvesículas y MUA/anti-TSG101 a modo de control negativo. Para evaluar el pegado de exosomas se empleó la siguiente estrategia experimental:

Método "signal off" (desaparición de señal):

Esta estrategia consistió en inmovilizar anticuerpos monoclonales murinos anti-CD9, y someter los electrodos a las muestras de exosomas. Posteriormente se agregaron anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conjugados a HRP. Se observó que a mayor concentración de exosomas, el pegado del anticuerpo secundario disminuía, con la consecuente disminución en la señal de reducción del TMB oxidado. Se evidenció una relación logarítmica entre la concentración de exosomas y la señal analítica obtenida.

2.3 Utilización de métodos no electroquímicos.

Se verificó por microscopía electrónica de barrido (SEM) el pegado de los exosomas sobre los electrodos modificados con MUA/anti-CD9, como método independiente (no electroquímico) para evidenciar el pegado y evaluar su especificidad.

3. Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.

Se cumplieron la mayoría de las etapas propuestas, menos el análisis por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) ya que no se pudo encontrar los parámetros que se ajusten a nuestras condiciones experimentales. De todos modos, cabe señalar que la metodología estudiada y desarrollada tiene un enorme potencial, pues se trata de una técnica amperométrica, y por consiguiente, altamente compatible con procesos de miniaturización y automatización para los futuros prototipos.

4. Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no - con los resultados esperados por parte del equipo.

Se logró modificar con éxito la superficie del electrodo de trabajo mediante una monocapa-autoensamblada. La verificación se realizó mediante VC de la cupla ferro/ferri, observando la

disminución de las corrientes de oxidación/reducción debido a la repulsión electrostática de la cupla ferro/ferri originada por el carboxilato expuesto de la SAM, y mediante la inmovilización de anticuerpos anti-IgG/HRP, midiendo la corriente de reducción del TMB-Oxidado. Se observó que a mayor concentración de MUA hay más anticuerpos inmovilizados, pero a su vez, se obtuvo una curva de saturación. Se definió por tanto la concentración óptima de MUA (100mM), la cual fue utilizada en los subsecuentes ensayos. También se comprobó que las inmovilizaciones de los anticuerpos sobre el electrodo modificado fueron exitosas.

Luego se procedió a analizar el bloqueo del electrodo, a efectos de minimizar la señal inespecífica. Esto se analizó mediante la inmovilización del anticuerpo anti-IgG/HRP con diferentes concentraciones de PBS-BSA. También se evaluó el efecto de la temperatura. Se determinó la concentración de PBS-BSA óptima, la cual permite bloquear la superficie pero a su vez recuperar la señal (3%).

También se logró optimizar la concentración óptima de anticuerpos a inmovilizar sobre la superficie del electrodo, obteniéndose una típica curva de saturación (luego de una determinada concentración de anticuerpos ya no aumentaba el número de anticuerpos inmovilizados, presumiblemente debido al agotamiento de los lugares disponibles en el MUA y a efectos estéricos provocados por los anticuerpos ya pegados). También se optimizó el método de detección aplicable en el futuro para la detección de exosomas ("signal off").

Por último, la captura de exosomas también pudo ser observada mediante SEM ya que los exosomas presentan un tamaño de 100nm, discriminándose de otras vesículas extracelulares de mayor tamaño. Esto permitió obtener una comprobación independiente de que efectivamente los exosomas se están inmovilizando con éxito sobre la superficie del sensor.

Los resultados obtenidos fueron los esperados por parte del equipo, cumpliendo tanto el objetivo general como los específicos planteados. Se concluye que se obtuvo un inmunosensor capaz de cuantificar exosomas proveniente de medio condicionado, discriminándolos adecuadamente de otros tipos de vesículas extracelulares. Estos resultados sirven de base para futuros estudios en muestras biológicas reales, y la posterior implementación de los métodos aquí desarrollados en un prototipo de biosensor aplicable en ensayos descentralizados.

5. Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.)

Se divulgó los resultados obtenidos ante la comunidad científica local en las 9as Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM), llevada a cabo los días 15 y 16 de Octubre del 2015 en formato poster. Cabe destacar que dicho poster fue premiado (premio INIA).

6. En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

Realizar este proyecto de investigación siempre fue un desafío, puesto que no hay aún otros grupos de investigación que realicen inmunosensores para exosomas específicamente, por lo tanto la bibliografía es escasa. De igual forma, debido a la amplia experiencia que se posee en

la Unidad de Bioquímica Analítica sobre el tema de los biosensores, pudimos sortear las dificultades que se nos presentaron en el camino, obteniendo buenos resultados finales.

7. En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.

Nuestros comentarios es de agradecimiento ya que pudimos tener un primer contacto como estudiantes a una investigación real, en la cual, además de profundizar nuestros estudios nos ayudó a trabajar en equipo como a enfrentarnos y resolver los problemas cotidianos que se le presentan a un investigador.

8. Resumen publicable:

INMUNOSENSOR PARA EL AISLAMIENTO DE EXOSOMAS EN SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES.

Los exosomas son vesículas extracelulares de aproximadamente 100nm secretadas por la mayoría de las células y especialmente por las células tumorales. Estas vesículas pueden ser internalizadas por otros tipos celulares, por lo que juegan importantes roles en la comunicación intercelular. Más allá de su rol biológico, los exosomas transportan por el torrente sanguíneo un muestreo del contenido de proteínas y ARNs expresados por sus células parentales. De aquí que exista gran interés en disponer de métodos rápidos y eficientes para la captación y análisis de exosomas tumorales circulantes, por su promisorio uso como biomarcadores no invasivos. Sin embargo, las tecnologías actuales para el aislamiento y cuantificación son laboriosas y/o costosas. Por esto nuestro objetivo es el desarrollo de un inmunosensor de base electroquímica que permita la purificación y cuantificación de exosomas de una forma rápida y compatible con la automatización. Por medio de la formación de una monocapa auto-ensamblada de ácido mercaptoundecanoico sobre electrodos serigráficos de oro, hemos inmovilizado anticuerpos anti-CD9 sobre la superficie del biosensor, logrando una plataforma de anclaje para los exosomas. Luego de optimizar las condiciones de inmovilización, hemos procedido a evaluar el pegado de exosomas purificados de medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Al aumentar la cantidad de exosomas retenidos en la superficie del biosensor, disminuye proporcionalmente la corriente originada por la reducción electroquímica del sustrato TMB, previamente oxidado por la enzima peroxidasa funcionalizada a anticuerpos anti-IgG agregados junto a la muestra. Se logra así la obtención de un dispositivo capaz de cuantificar exosomas, discriminándolos adecuadamente de otros tipos de vesículas extracelulares. Estos estudios sirven de base para el desarrollo de un prototipo de biosensor portátil, capaz de detectar exosomas en muestras biológicas tales como sangre y orina.

Integrantes de equipo: Ximena Doldán, Pablo Fagundez, Romina Mazzuco.
Orientador: Mag. Juan Pablo Tosar

Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares (Facultad de Ciencias-UdelaR)

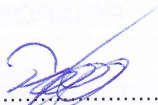
9. En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
	<i>No se obtuvieron equipos</i>

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año
	<i>No se obtuvo bibliografía</i>

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- *Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)*



FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

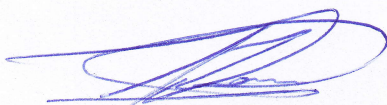
Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

Comentarios del docente orientador:

Creo que el desempeño del equipo estudiantil fue óptimo. Como bien lo explican en su informe, no fueron pocas las veces que se enfrentaron a escollos y problemas (que son inherentes a las tareas de investigación), pero con trabajo, esmero y reflexión los distintos problemas se fueron solucionando, obteniéndose al final resultados muy interesantes, reproducibles, y con un enorme potencial. Se desarrollaron dos métodos reproducibles para la detección de exosomas, con la capacidad de discriminar otros tipos de vesículas extracelulares que muchas veces ocasionan interferencias. Con un sistema de detección amperométrica, los resultados obtenidos son compatibles con el diseño futuro de un dispositivo analítico portátil y automatizable.

Este trabajo ha dado pie a una presentación en un congreso nacional (en formato póster, que fue premiado), e implicará parte de la tesina de graduación de uno de los miembros del equipo estudiantil. Realizando algunos pocos ensayos complementarios que están faltando, se espera tener pronto para principios de 2016 un manuscrito a ser enviado a una revista científica arbitrada.

En resumen, estoy de acuerdo en todos sus términos con el informe presentado, y con el resumen publicable.



FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR