EXTRACCIÓN DE miRNAs CIRCULANTES EN PLASMA: OPTIMIZACIÓN DE UN NUEVO SERVICIO DEL BIOBANCO INCLIVA

L. Peiró-Chova[1], O. Bahamonde[1], M. Seco-Cervera[2], PA. Rubio-Belmar[3], P. Bas[3], T. Bas[3], JL. García-Giménez[2]

1. *Biobanco INCLIVA, Fundación Investigación Clínico de Valencia Instituto de Investigación Sanitaria-INCLIVA.
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER); Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universitat de València; Fundación INCLIVA, Valencia.
3. Unidad de Raquis, Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

biobanco@incliva.es

*Red Nacional de Biobancos Hospitalarios (ReTBioH). ISCIII / FEDER, Ministerio de Economía y Competitividad (RD09/0076/00132)

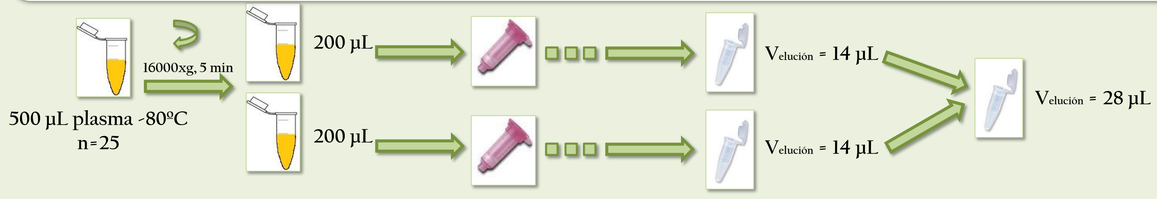
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

La presencia de microARNs o miRNAs circulantes en el plasma hace de estas pequeñas moléculas candidatos a convertirse en biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Sin embargo, la utilidad de los miRNAs como biomarcadores requiere procedimientos optimizados y estandarizados de manipulación, extracción y análisis, lo que supone todo un reto debido, principalmente, a la baja cantidad de estas moléculas en los fluidos biológicos. La puesta a punto de estos procedimientos resulta indispensable para poder ofertar estos servicios en un Biobanco. El objetivo del trabajo es la optimización del procedimiento de extracción de miRNAs a partir de muestras de plasma humano preservadas a -80ºC y análisis de la calidad de estos miRNAs.

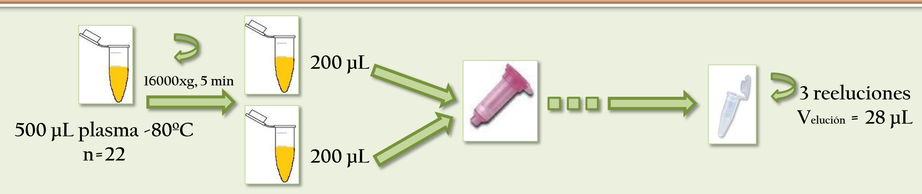
MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de miRNAs circulantes en plasma *miRNeasy Serum/Plasma* (QIAGEN®)

P1: instrucciones fabricante: 2 extracciones por muestras



P2: procedimiento modificado: 2x Vinicial, 2x Velución, 3 reeluciones



Cuantificación y análisis (ARNtotal y miRNAs) : P1 vs P2

Cantidad y pureza (ARNtotal)



Nanodrop 2000

- Cantidad ARNtotal (ng/uL)
- Relación A260/280

Integridad y tamaño (ARNtotal y miRNAs)

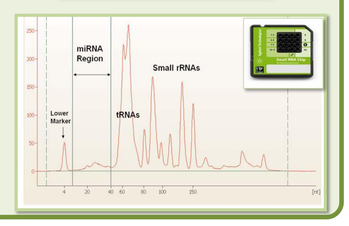


Agilent 2100 bioanalyzer

- *Agilent RNA 6000 Nano chip*
- *Agilent Small RNA chip*



Valor de RIN



RESULTADOS

Mayor cantidad de ARNtotal en P2 vs P1

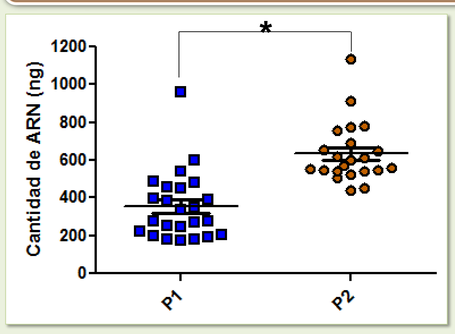


Figura 1: Cantidades de RNAtotal (ng) obtenidas con P1 y P2. Se observan diferencias significativas entre P1 y P2 (cantidad media P1=354,3 ± 176,7 ng vs cantidad media P2=634,0 ± 160,7 ng; p<0.001; t-test).

No se observaron diferencias de pureza del ARNtotal P1 vs P2

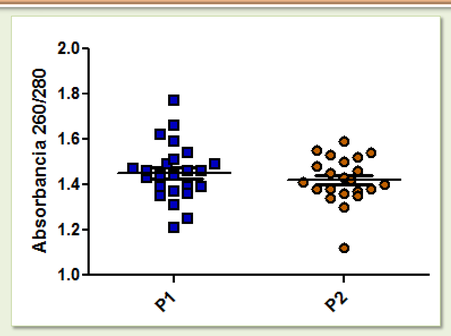
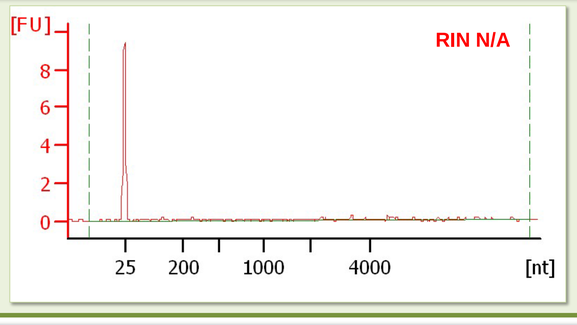


Figura 2: Relaciones de A260/280 obtenidas con P1 y P2. No se observan diferencias significativas entre P1 y P2 (A260/280 media P1=1,45 ± 0,12 vs A260/280 media P2=1,42 ± 0,10; p<0.05; t-test).

La integridad del ARNtotal no se pudo determinar

RNA Area:	6,1
RNA Concentration:	5 ng/µl
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0
RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
Result Flagging Color:	
Result Flagging Label:	RIN N/A

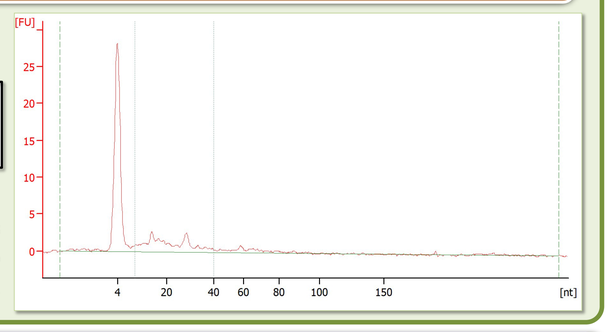
Figura 3: Electroferograma tipo del ARNtotal obtenido a partir de una muestra de plasma sanguíneo (*Agilent RNA 6000 Nano Chip* con el Agilent 2100 Bioanalyzer).



Elevado contenido de miRNAs (superior a 55%)

Small RNA Concentration [pg/µl]:	388,6 Result Flagging Color:	
miRNA Concentration [pg/µl]:	319,4 Result Flagging Label:	82 % miRNA; Concentration: 319.40 pg/µl
miRNA / Small RNA Ratio [%]:	82	

Figura 4: Perfil electroforético tipo de los *small* ARNs obtenidos a partir de una muestra de plasma sanguíneo (*Agilent Small RNA Chip* con el Agilent 2100 Bioanalyzer).



CONCLUSIONES

- El plasma humano contiene muy baja cantidad de ARN, por lo que los controles de calidad habituales no resultan adecuados para este tipo de muestras.
- Los kits comerciales para el aislamiento de miRNAs circulantes en fluidos biológicos como el plasma, pueden ser adaptados para mejorar su rendimiento, permitiendo alcanzar cantidades suficientes para emplear plataformas de alto rendimiento.
- Los Biobancos deben estar preparados para poder ofrecer nuevos servicios que cubran las demandas de los investigadores.