



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
ÁCIDOS PEPTIDONUCLEICOS (APNs) EN EL
DESARROLLO DE BIOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS

Autor: Jorge Torres Chaves

Fecha: 10/01/2020

Tutor: Marta Sánchez-Paniagua López

ÍNDICE

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCIÓN**
- 3. MATERIAL Y MÉTODOS**
- 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- 5. CONCLUSIONES**

1.- RESUMEN

El estudio se ha centrado en la revisión bibliográfica de los diferentes tipos de biosensores electroquímicos que se han desarrollado basados en sondas de ácidos peptidonucleicos (APN) para la detección de ácidos nucleicos (ADN, ARN) mediante una reacción de hibridación. Todo ello se ha traducido en nuevos métodos de análisis químico y clínico para multitud de aplicaciones, tanto de la detección de dianas terapéuticas de aplicación farmacéutica, como de identificación en otros campos de interés, todo basado desde el punto de vista analítico y molecular.

Se ha hecho un recorrido por los diferentes métodos de detección, fijándose sobretodo en el límite de detección obtenido con los dispositivos desarrollados y que éste fuese lo más bajo posible para la detección de muy bajas concentraciones de analito y que la medida cuantitativa fuese reproducible bajo diferentes condiciones.

Los biosensores electroquímicos basados en APN hasta ahora desarrollados han sido idóneos desde el punto de vista analítico (alta especificidad y bajo límite de detección) y también económico y de mayor simplicidad, si los comparamos con otros dispositivos de detección de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..

A lo largo de estos últimos años, se han implementado nuevos biosensores de materiales cada vez más idóneos desde el punto de vista analítico y físico-químico para permitir una detección cada vez más precisa y exacta, y que no se saliese de los estándares económicos para que fuese altamente reproducible.

Palabras clave: biosensor electroquímico, biosensor de ADN, ácidos peptidonucleicos, APN.

2.- INTRODUCCIÓN

En términos generales, un biosensor se puede definir como un dispositivo analítico capaz de traducir la reacción de reconocimiento molecular del analito de interés, comúnmente llamado ligando, con su propio receptor específico en una señal que pueda ser medida y cuantificada. Este proceso, denominado transducción, implica que el mecanismo de detección se lleva a cabo por parte de un receptor que debe estar inmovilizado en la zona sensora del dispositivo que se encuentra íntimamente ligada al sistema transductor. Cuando en un biosensor tiene lugar el reconocimiento biológico entre el receptor y el ligando, se producen ciertos cambios en diferentes parámetros físico-químicos, tales como cambios de masa, de potencial, de intensidad luminosa, etc, que pueden ser registrados por el sistema transductor, de forma que se genere una señal apropiada o asociada a dicha magnitud, y que es proporcional a la concentración de la sustancia a analizar o analito.

Por tanto, un biosensor permite medir, cuantificar y analizar en tiempo real un proceso de interacción entre biomoléculas. Los dos constituyentes del biosensor, receptor (elemento de reconocimiento de naturaleza biológica que interacciona de manera selectiva con el analito) y transductor, forman una unidad funcional, cuya selectividad viene dada por la parte biológicamente activa (1). La sensibilidad adecuada se va a poder conseguir mediante un mecanismo de transducción adecuado. (Figura 1)

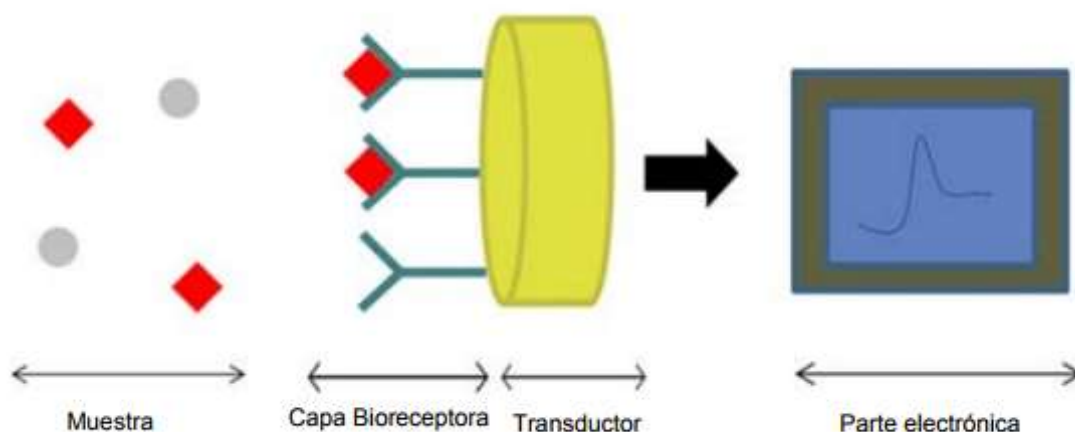


Figura 1. Esquema de un biosensor.

2.1. Tipos de biosensores

Los biosensores pueden ser clasificados según diversos criterios. La clasificación puede establecerse en función del *tipo de receptor inmovilizado*, permitiendo diferenciar los distintos tipos de biosensores según tengan inmovilizado moléculas de ADN, proteínas (enzimas, anticuerpos, péptidos...), o bien una molécula artificial, como polinucleótidos basados en enlace peptídico (APN) (2-4), ribozimas (5), polímeros de huella molecular (6, 7) o incluso, un sistema biológico complejo, como una célula o un tejido (8, 9).

Según el *tipo de componente biológico inmovilizado*, va a condicionar el tipo de aplicación para la cual el biosensor va a estar dirigido. De igual forma, condicionará el tipo de reacción que puede tener lugar entre el receptor y el analito y, a su vez, el formato o forma mediante la cual se va a llevar a cabo su detección: basada en la afinidad entre ambos, o en una detección en la que el analito además puede sufrir otras reacciones químicas/bioquímicas. Esto permite introducir otra clasificación entre los biosensores según éstos sean catalíticos o de afinidad.

Los biosensores también se pueden clasificar según el *tipo de sistema transductor empleado*, y por lo tanto, en el principio físico del fenómeno de la transducción. Éste último se encuentra íntimamente ligado al sistema detector que es el que permite monitorizar los cambios que el transductor registra como consecuencia de los procesos de reconocimiento molecular y/o catalíticos que tienen lugar en la superficie biosensora. En definitiva es el propio transductor, el que va a determinar la eficacia en el procesado de la señal del biosensor.

En cuanto a los diversos tipos de sistemas transductores que se pueden utilizar en los biosensores se pueden diferenciar: Ópticos, Termométricos, Mecano-acústicos y Electroquímicos.

Este trabajo se centra en el uso de biosensores electroquímicos, los cuales vana registrar el cambio electroquímico que se produce como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular, que es proporcional a su vez a la concentración del analito que se desea detectar (10, 11). Se diferencian varios tipos:

- a) Amperométricos: Determinan corrientes eléctricas asociadas con los electrones involucrados en los procesos de óxido-reducción. (12, 13).
- b) Potenciométricos: Emplean electrodos selectivos a ciertos iones para determinar cambios en la concentración de los iones escogidos (ej. electrodo selectivo a H^+) (14).
- c) Conductimétricos: Miden cambios en la conductancia asociados con cambios en el ambiente iónico de las soluciones.

Todos los criterios de clasificación anteriormente citados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los biosensores en función del tipo de receptor biológico, tipo de reacción receptor-analito, y tipo de sistema transductor.

Tipo de receptor biológico inmovilizado	
Proteínas	Enzimas, Anticuerpos, Péptidos
Ribozimas	
ADN	
Moléculas artificiales	Ácidos peptidonucleicos (APNs)
Sistema biológico complejo	Células, Tejidos
Tipo de reacción entre receptor y analito	
Catalíticos	
Afinidad	
Tipo de sistema transductor	
Ópticos	Absorción
	Fluorescencia
	Onda evanescente (Refractométricos)
Termométricos	
Mecano-acústicos	Piezoeléctricos
	Nanomecánicos
Electroquímicos	Amperométricos
	Potenciométricos
	Conductimétricos

Para el desarrollo de un dispositivo que funcione correctamente resulta crucial, además de la elección de un material biológico y de un método de inmovilización adecuados, escoger un sistema de transducción óptimo. Son múltiples los factores que influyen en la elección del transductor destacando la facilidad de fabricación, posibilidad de miniaturización, estabilidad y resistencia. De todos los sistemas transductores anteriormente detallados, puede decirse que son los dispositivos electroquímicos los más utilizados como transductores en biosensores. Los biosensores electroquímicos implican la medida de cambios de las propiedades eléctricas de una disolución al producirse o consumirse electrones o iones por medio de reacciones químicas.

Algunas de las ventajas de los biosensores electroquímicos se destacan a continuación:

- a) Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños, incluso del orden de nanolitros, con relativa facilidad debido a la naturaleza interfacial de la medida electroquímica. Esto hace que tales dispositivos sean especialmente apropiados para la monitorización "in vivo".
- b) La señal obtenida es eléctrica, y permite la transducción directa de la reacción en la señal de lectura.
- c) Los límites de detección que se obtienen, (normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} mol x L⁻¹), son suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.
- d) La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

En un biosensor electroquímico de ADN, también llamado genosensor, se lleva a cabo la conversión del evento biológico (hibridación) en una señal medible, usando como elemento de reconocimiento una secuencia de oligonucleótidos complementaria a la secuencia de ADN que pretendemos determinar y que, en nuestro caso, es el analito (Figura 2).

Mediante esta reacción se da lugar a un híbrido de doble hebra gracias a la complementariedad de las bases, la cual hace posible la detección de genes específicos de una especie. La hibridación se produce de forma eficaz y selectiva, aunque existan otros ácidos nucleicos no complementarios con el analito, ya que la unión tiene lugar gracias al reconocimiento de la secuencia de bases.

Gracias a los avances en la síntesis de ADN, que han permitido el diseño de sondas complementarias a las secuencias de bases que queremos analizar, además de las ventajas anteriormente citadas, esta técnica analítica ha adquirido un gran protagonismo respecto a las ya existentes.

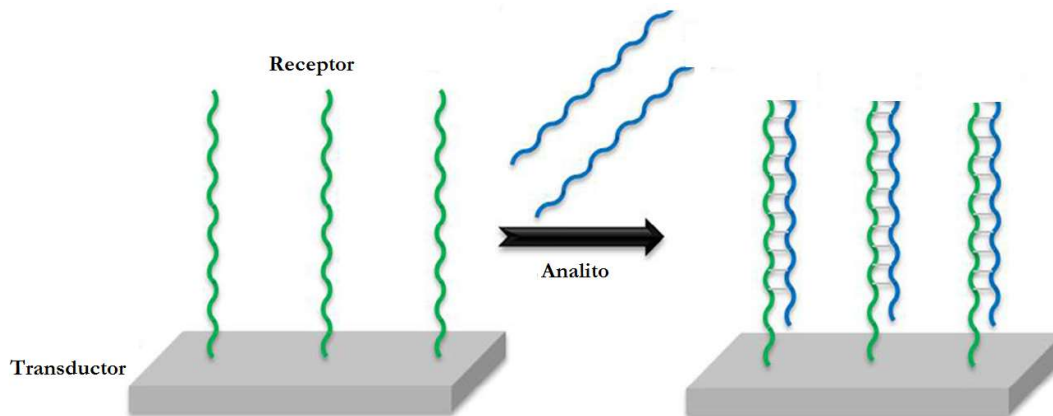


Figura 2. Esquema general de un genosensor de ADN

2.2. Ácidos peptidonucleicos (APN)

En esencia, los APN son ácidos peptidonucleicos en los que se sustituyen los enlaces fosfodiéster del azúcar-fosfato, que forman el esqueleto del ADN, por enlaces peptídicos entre unidades de N-(2-aminoetil) glicina repetidas (Figura 3). La distancia entre las bases no cambia y la hibridación entre APN y su secuencia de ADN complementaria sigue las reglas de Watson-Crick. Los híbridos APN/ADN tienen mayor estabilidad térmica que los ADN/ADN como consecuencia del esqueleto neutro de los APN. En definitiva, las secuencias de APN de hebra simple presentan mejores propiedades de hibridación y estabilidad química y enzimática que los ácidos nucleicos.

En el APN el espacio entre bases semejante a las secuencias de ADN y carga neutra. Esto supone:

- Mayor afinidad por la secuencia de ADN complementaria
 - Mejor discriminación
 - Uso de sondas cortas (10-15 mer)
 - Mayor estabilidad
 - Biológica
 - Estructura no propensa a la degradación por nucleasas

- Térmica
 - Hibridación más rápida a temperatura ambiente y superior
- Química
 - Dependencia mínima de la fuerza iónica

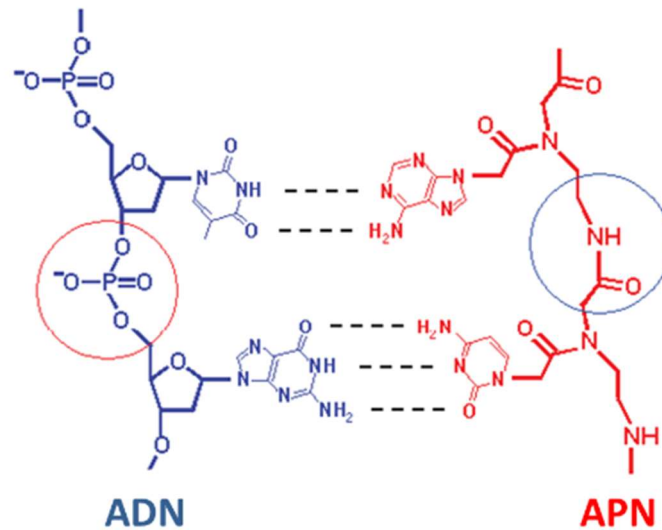


Figura 3. Estructura química del ADN vs. el APN y su método de hibridación.

El APN es un “imitador” de ADN compuesto de nucleobases naturales y esqueleto pseudopeptídico. Siendo una molécula basada en poliamida, el APN exhibe una elevada estabilidad térmica/química al igual que una resistencia a la degradación mediada por nucleasas. Además, el esqueleto eléctricamente neutro permite al APN hibridar con ADN o ARN complementario con gran afinidad y especificidad. Por lo tanto, el APN puede emplearse no sólo como una potente herramienta para la biología molecular y los diagnósticos genéticos, sino que también un poderoso candidato destinado a la detección de fármacos (15). Hay trabajos que demuestran la eficacia y estabilidad de los APN en el diseño de biosensores voltamperométricos. Aunque existen algunos trabajos que muestran las ventajas de los APN-biosensores, es éste un campo aún por explorar.

Recientemente, muchos investigadores han demostrado varios biosensores basados en nanomateriales en combinación con APN (16). Por ejemplo, un sistema detector basado en el óxido de grafeno (OG) usando sondas de APN fue desarrollado para detección de dianas bio-específicas (17, 18), ensayos de actividad enzimática (19), detección de ácido nucleico de doble hebra (20), al igual que imágenes de biomoléculas de células vivas (16).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo, se ha realizado una revisión bibliográfica de los diversos tipos de biosensores electroquímicos basados en ácidos peptidonucleicos, APN, bien sea la detección de diversos patógenos o el diagnóstico de patologías relacionadas con el ser humano principalmente.

Las bases de datos utilizadas para la búsqueda de artículos científicos fueron PubMed y Elsevier principalmente. Palabras clave utilizadas: biosensor electroquímico, biosensor de ADN, ácidos peptidonucleicos, APN.

4.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A continuación se muestra una tabla comparativa de los diferentes biosensores de tipo electroquímico que se consideran más relevantes, por el tipo de analito detectado y/o las propiedades analíticas obtenidas:

Biosensor	Diana	Límite de detección	Rango lineal	Ref.
Electroquímico	oligómeros de ADN de doble hebra (Virus Hepatitis C)	$1,8 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	(21)
Electroquímico	amplicón de PCR	$4,8 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	(22)
Electroquímico	ADN (oligómero) y ARN	$10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ (ADNoligo), 10^{-7} g (ARN total)	$1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$	(23)
Electroquímico	miARN-145	$0,37 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-15} - 1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	(24)
Electroquímico	miARN let-7a, let-7b, let-7c	$0,50 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$	-	(25)
Electroquímico	secuencias de ADN monocatenaria	-	-	(26)
Electroquímico	mutaciones en el ADN que afectan al gen BRAF y la proteína KRAS	1 fg mL^{-1}	-	(27)
Electroquímico	mutaciones en el ADN que afectan al gen BRAF y la proteína KRAS	1 fg mL^{-1}	-	(28)
Electroquímico	pVHC3a	$5,7 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$	-	(29)
Electroquímico	M. Tuberculosis	$8,948 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	(30)
Electroquímico	hibridación del ADN	$5,6 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$	$5,0 \times 10^{-9} - 2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (R=0,9940)	(31)
Electroquímico	Hg ²⁺	$4,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	$5,0 \times 10^{-9} - 5,0 \times 10^{-7} \text{ nmol L}^{-1}$	(32)
Electroquímico	M. Tuberculosis	$0.1 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ (APN/Fe ₃ O ₄), $0.1 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ (APN-electrodo)	-	(33)
Electroquímico	hibridación del ADN	$2 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$	-	(34)
Electroquímico	pequeñas secuencias de la proteína p53	$6,82 \times 10^{-10} \times 10^{-10}$	-	(35)
Electroquímico	ADN de organismos genéticamente modificados	$1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	-	(36)

De todos los biosensores electroquímicos anteriormente descritos y referenciados, el estudio se ha centrado en aquellos que presentaban mayor enfoque en el campo de interés de nuestro estudio; es decir, en el campo de Ciencias de la Salud en cuanto a patologías del ser humano.

Artículo 1)

En el siguiente artículo se desarrolló una plataforma electroquímica de modo dual altamente sensible para la detección de microARN (24):

Los microARN juegan un papel crucial en la regulación de genes que afectan a varias enfermedades humanas; entre las que se encuentra el cáncer, convirtiéndolos en unos prometedores biomarcadores. Sin embargo, como los niveles bajos niveles de miARN presentes en sangre son bajos, su uso como biomarcadores del cáncer requiere del desarrollo de métodos analíticos simples y eficaces.

Muchos estudios recientes muestran como el miR-145 es un miARN supresor de tumores, que está bajamente regulado en varios tipos de cáncer, incluido cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata (PCa).

Entre las tecnologías convencionales usadas para el estudio de miARN se incluyen el northern blott, la hibridación *in situ*, la PCR cuantitativa y los microarrays de miARN. Estas técnicas, aunque poderosas, son laboriosas y por tanto restringidas para los laboratorios.

Para suplir dicho reto, los biosensores electroquímicos se consideran una alternativa adecuada, gracias a las diversas ventajas que presentan tales como alta especificidad, portabilidad y bajo coste. Aunque hay multitud de estudios centrados en la detección de microARN mediante métodos electroquímicos, obteniéndose niveles de hasta femtomolar en la cuantificación de la hibridación de miARN con impedancia electroquímica, en general estos dispositivos mostraron falta de simplicidad en su proceso de fabricación.

En este sentido, en este trabajo se desarrolló una plataforma electroquímica de modo dual altamente sensible para la detección de microARNs utilizando ácidos peptidonucleicos como sondas en superficies de electrodos de oro para su hibridación específica con la molécula diana que en este caso es microARN (miR-145). Se empleó una estrategia de amplificación usando nanopartículas de oro cargadas positivamente (AuNPs). Para la medida de la reacción de hibridación se utilizó la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), técnica no destructiva ampliamente utilizada para la detección de secuencias específicas de ADN libre de marcaje. Con esta técnica se permite monitorizar los cambios producidos en las propiedades interfaciales entre el electrodo y el electrolito, antes y después de la reacción de hibridación sonda-analito.

Además, se llevaron a cabo medidas voltamperométricas, utilizando como sonda redox ferroceno tiolado, observándose un incremento en la intensidad de oxidación del ferroceno a medida que aumenta la concentración de miARN. Este dispositivo dual permite la detección de miARN-145 con un límite de detección (LOD) de 0,37 fM y un amplio rango dinámico de 1 fM hasta 100 nM con una clara distinción de secuencias de miARN no enlazantes. La plataforma electroquímica desarrollada puede ser fácilmente expandida a lo largo de otras detecciones de miARN/ADN para el desarrollo de plataformas de microarrays.

La figura 4 muestra un esquema de la estrategia de detección empleada (a-d), y los cambios ilustrados en las propiedades eléctricas del electrodo de oro durante el proceso de modificación mediante EIS (e). Un valor relativamente bajo de resistencia a la transferencia de carga, R_{ct} , de unos 2,9 $k\Omega$ fue registrado con el electrodo modificado con APN-MCH, debido a la barrera física impuesta por la presencia de la capa autoensamblable (SAM). El valor de resistencia a la transferencia de carga prácticamente no varía tras la incorporación de las nanopartículas de oro al electrodo. El biosensor modificado (MCH-APN+AuNPs) fue incubado con miARN-145, observándose después de la hibridación un incremento significativo de R_{ct} desde 2,9 $k\Omega$ hasta 11,9 $k\Omega$. El incremento de R_{ct} se atribuye a la formación del dúplex APN/miARN-145, haciendo que la superficie del electrodo quede altamente cargada negativamente y creando una barrera electrostática hacia el marcador redox cargado negativamente en la disolución de medida.

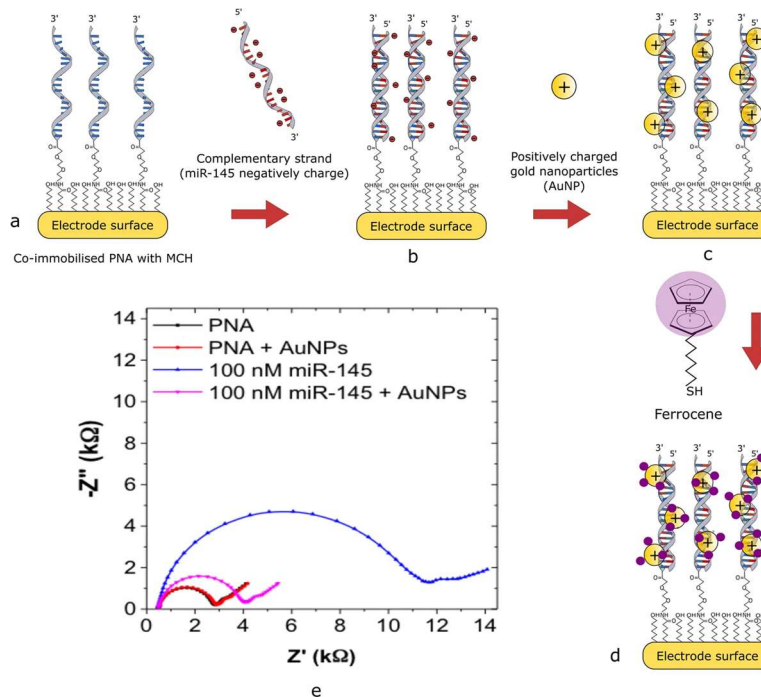


Figura 4. Esquema de la construcción del biosensor. (a) Sondas de APN inmovilizadas; (b) captura de la diana (ADN/miARN); (c) Interacción electrostática final de las AuNPs cargadas positivamente con APN/ADN o híbrido APN/miARN; (d) Unión del ferroceno tiolado a las AuNPs; (e) Caracterización EIS de los eventos de unión utilizando un biosensor basado en APN: la curva negra representa el biosensor basado en APN, la curva roja representa la unión no específica de las AuNPs, la curva azul representa la hibridación del miARN-145 con las sondas de APN, y la curva magenta representa la interacción electrostática de las AuNPs con el dúplex APN/miARN-145.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas en el estudio se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de miARN y sondas de APN utilizadas en este trabajo. La secuencia complementaria completa en la primera línea corresponde a la secuencia de miARN-145. AEEA es un “linker” glicólico de nueve átomos (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico).

Tipo de Secuencia	Secuencia
Secuencia complementaria completa (miARN-145):	3'-UCC CUA AGG ACC CUU UUU GAC CUG-5'
Secuencia no complementaria:	3'-AAA UGC CUA UAG ACC CUU GAC CUG-5'
Secuencia desajustada 1:	3'-UCC CUA <u>UGG</u> ACC CUU UUU GAC CUG-5'
Secuencia desajustada 2:	3'-UCC <u>AUA</u> <u>AGC</u> ACC CUU UUU GAC CUG-5'
Sonda APN 2: SH-C6-TTT	AGG GAT TCC TGG G
Sonda APN1: C6-AEEA-TTT	AGG GAT TCC TGG G

A modo de conclusión, en el presente trabajo, se diseñó y desarrolló un biosensor electroquímico de modo dual altamente sensible con una simple amplificación con AuNP para la detección de microARN-145. Mediante medidas de impedancia electroquímica se demostró que las nanopartículas de oro depositadas en la superficie electródica pueden interrumpir la biocapa dieléctrica del sensor, llevando a significantes cambios en la capacitancia del sistema. Además, se observó un aumento muy acusado del valor de resistencia a la transferencia de carga tras el proceso de hibridación APN-microARN. Se llevaron a cabo medidas voltamperométricas, utilizando ferroceno tiolado como sonda redox, observándose un incremento en la intensidad de oxidación del ferroceno a medida que aumenta la concentración de miARN, lo que demuestra que el dispositivo desarrollado puede ser utilizado para el análisis cuantitativo.

Con el actual sistema basado en APN, se obtuvo un amplio intervalo lineal desde 1 fM hasta 100 nM con un límite de detección de 0,37 fM. La importancia más significativa es que la técnica de detección puede ser reproducida fácilmente y expandirse en técnicas de microarrays .

Artículo 2)

En el siguiente artículo se desarrolló un nuevo biosensor electroquímico basado en papel usando una sonda de ácido peptidonucleico con pirrolidina (acpcAPN) marcada con antraquinona (AQ-APN) y un electrodo modificado con grafeno-polianilina (G-PANI) para detectar el virus del papiloma humano (HPV) (37):

Los factores más importantes para los dispositivos de diagnóstico, especialmente para países en vías de desarrollo, son el bajo coste, la simplicidad y la velocidad en la obtención de los resultados para hacer un “screening” rápido y para monitorizar los biomarcadores de la enfermedad. Para conseguir este objetivo, los dispositivos analíticos basados en papel han sido ampliamente utilizados como dispositivos alternativos en el diseño de aplicaciones para puntos de cuidado (“point-of-care” (POC)).

Por otro lado, el HPV es un virus que puede aparecer tras cualquier tipo de contacto sexual. Hay muchos tipos de HPV de alto riesgo, incluidos el tipo 16 y 18, que pueden causar cambios anormales en las células del cérvix. Estos cambios pueden derivar en un cáncer de

cérvix, el cual es uno de los más importante problemas de salud para las mujeres. La mortalidad derivada del cáncer de cérvix se ha incrementado especialmente en países en vías de desarrollo que tienen instalaciones médicas limitadas.

En este trabajo, se empleó una técnica de impresión por chorro de tinta para preparar un electrodo modificado basado en papel (G-PANI). La sonda de AQ-APN que emplea un aminoácido cargado negativamente en el extremo N-terminal fue inmovilizada en la superficie del electrodo a través de atracción electrostática. La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) fue utilizada para detectar la reacción de hibridación entre un oligonucleótido diana sintético de 14 bases con una secuencia correspondiente al ADN del virus del papiloma humano (HPV) tipo 16. Además, se midió la señal de respuesta electroquímica de la parte marcada con AQ utilizando un voltamograma de ondas cuadradas antes y después de la hibridación. Se observó que la señal decreció significativamente después de la adición del ADN diana. Este fenómeno se explica por la rigidez del dúplex APN-ADN, que obstruye la accesibilidad de la transferencia de electrones de la parte marcada con AQ a la superficie del electrodo. Bajo óptimas condiciones, el límite de detección del dispositivo analítico desarrollado en la detección de HPV tipo 16 fue de 2,3 nM con un rango lineal entre 10-200 nM. La aplicación de este biosensor al análisis de muestras de ADN reales fue testado mediante la detección de ADN amplificado por PCR del "SiHa cell line".

A continuación, se muestran detalles concretos del biosensor desarrollado.

Las secuencias de oligonucleótidos empleadas se muestran en la Tabla 3. También hay que tener en cuenta el cebador (5'-CACTATTTGGAGGACTGGA-3') y el cebador reverso (5'-GCCTTAAATCCTGCTGTAG-3') utilizados para las muestras de la PCR.

Tabla 3. Listado de oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
ADN complementario (HPV tipo 16)	5'-GCTGGAGGTGTATG-3'
ADN no complementario 1 (HPV tipo 18)	5'-GGATGCTGCACCGG-3'
ADN no complementario 2 (HPV tipo 31)	5'-CCAAAAGCCCAAGG-3'
ADN no complementario 3 (HPV tipo 33)	5'-CACATCCACCCGCA-3'

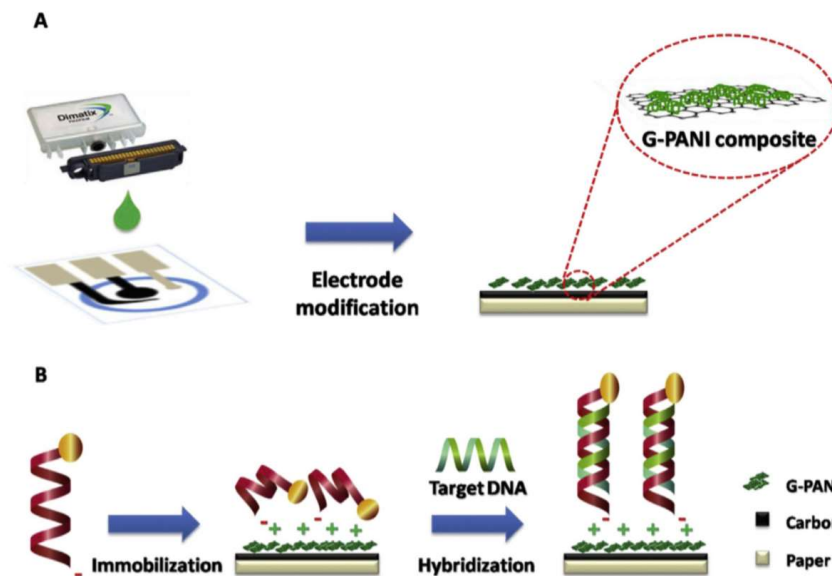
Para la fabricación del biosensor electroquímico de ADN basado en papel, se utilizó el método de impresión por cera ("wax-printing"). Inicialmente el papel patentado fue diseñado usando "Adobe Illustrator" e impreso en un filtro de papel (Whatman No.1) utilizando una impresora de cera (Xerox Color Qube 8570, Japón). La tinta de carbón fue proyectada como electrodo de trabajo y como un electrodo auxiliar. Posteriormente, la plata/cloruro de plata fue proyectada como electrodo de referencia y como almohadilla conductora.

Previo a la modificación del electrodo, se preparó un compuesto G-PANI utilizando un método físico de mezclado. Para ello, se dispersó polvo de grafeno en N-metil-2-pirrolidona (NMP) y sonificados durante 20 horas a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se dopó PANI (base esmeraldina (forma de polianilina altamente conductora)) con de ácido de

alcanfor 10-sulfónico para generar un grupo amino positivamente cargado y disuelto en NMP.

La tinta conductora G-PANI fue cargada en un cartucho e impresa en un electrodo del biosensor electroquímico basado en papel utilizando una impresora de materiales. La modificación del electrodo se muestra en el Esquema 1A. Seis capas de solución compuesta G-PANI fueron impresas sobre la superficie del electrodo. Después, el electrodo modificado fue calentado a 65°C durante 30 minutos para secar los disolventes de la tinta conductora G-PANI.

Para la inmovilización e hibridación de la sonda de APN, primero, la sonda de AQ-APN fue inmovilizada en la superficie del electrodo de carbono con G-PANI modificado. El electrodo modificado con AQ-APN/G-PANI fue hibridado con el ADN diana. Posteriormente, se midió la señal respuesta electroquímica por voltametría de onda cuadrada. Los procedimientos de inmovilización e hibridación están ilustrados en el Esquema 1B.



Esquema 1. Ilustración esquemática de la modificación del electrodo (A) y los pasos de inmovilización e hibridación del biosensor de ADN electroquímico basado en papel (B).

En cuanto a la caracterización electroquímica, la sonda inmovilizada de AQ-APN/G-PANI antes y después de la hibridación con el ADN diana fue investigada usando voltametría de ondas cuadradas (SWV), Figura 5. La inmovilización de la sonda AQ-APN/G-PANI dio lugar a un pico redox de aproximadamente -0,65 V. Después de la hibridación con una cantidad equimolar del ADN diana complementario, la respuesta electroquímica decreció significativamente debido a la rigidez del dúplex APN-ADN respecto a la sonda nativa de APN. La rigidez obstaculiza la transferencia de electrones entre la etiqueta redox activa (AQ) y la superficie del electrodo. Además, se observó un descenso en la señal electroquímica medida, a medida que aumenta la concentración de analito.

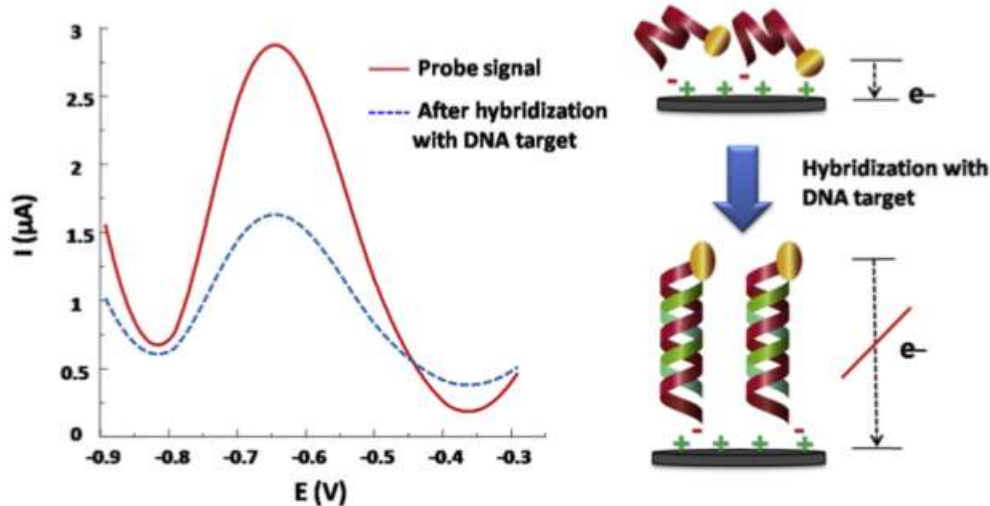


Figura 5. Voltamograma de ondas cuadradas de la sonda de APN inmovilizada sobre G-PANI antes y después de la hibridización con una concentración equimolar del ADN diana.

A modo de conclusión, el biosensor desarrollado resultó ser un dispositivo analítico económico y desechable, que es fácilmente incinerable tras su utilización y es prometedor para el “screening” y la monitorización del ADN del HPV tipo 16 para identificar los primeros estadios del cáncer cervical. El dispositivo analítico desarrollado en la detección de HPV tipo 16 presentó un límite de detección de 2,3 nM con un rango lineal entre 10-200 nM. El biosensor propuesto se aplicó al análisis de muestras de ADN reales obteniéndose resultados satisfactorios.

Artículo 3)

En el siguiente artículo se desarrollo un biosensor electroquímico de gran selectividad para la detección del ARN del Virus de la Hepatitis C (VHC) (38):

El virus de la hepatitis C (VHC), es un virus transmitido por la sangre que causa una hepatitis crónica infecciosa. Egipto tiene la epidemia más acusada para el VHC en el mundo, con acerca del 14,7% de la población egipcia. Así, el VHC, el cual puede causar graves riesgos para la salud humana incluyendo fallo de hígado, se convierte en una conciencia de salud pública para los egipcios. El desarrollo de biosensores altamente selectivos y sensibles para la detección precoz de niveles del VHC sin caras preparaciones de muestras ha recibido gran atención.

El VHC, a diferencia de la hepatitis A y B, no posee una vacuna para prevenirlo todavía. De acuerdo a la OMS, acerca de 200 millones de personas están infectadas del VHC alrededor de todo el mundo. Además, entre 3 y 4 millones de pacientes son infectados cada año. Un diagnóstico preciso y temprano de la infección activa del VHC es crítica, no sólo por la asociada morbilidad y mortalidad, sino también porque el diagnóstico temprano es el factor más importante para que el tratamiento sea un éxito. Diversas técnicas como el ELISA (“enzyme-linked immunoassays”), el RIBA (“recombinant immune blot assays”), la resonancia de plasmón superficial, la electroquimioluminiscencia, el genosensor piezoeléctrico, etc. fueron utilizados para detectar anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, la detección temprana del VHC utilizando dichos métodos no es factible debido a la ausencia

de anticuerpos contra los antígenos del VHC en los estadios tempranos de la enfermedad. Además, el testado de los anticuerpos anti-VHC no podían diferenciar entre una actual o una pasada infección. También, resultados de falsos negativos pueden aparecer en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o uremia. El testado de ácidos nucleicos (NAT) para el ARN del VHC se considera un método preciso de diagnóstico y monitorización para la enfermedad, al igual que una herramienta de diagnóstico confirmativo para los ensayos anti-VHC. Sin embargo, es demasiado caro y requiere una intensiva manipulación para un uso rutinario. En vista de dichas limitaciones, resulta importante el desarrollo de un ensayo de baja tecnología para la detección directa del ARN-VHC sin amplificar con una alta sensibilidad, selectividad, cortos ciclos de tiempo, y bajo coste-efectividad.

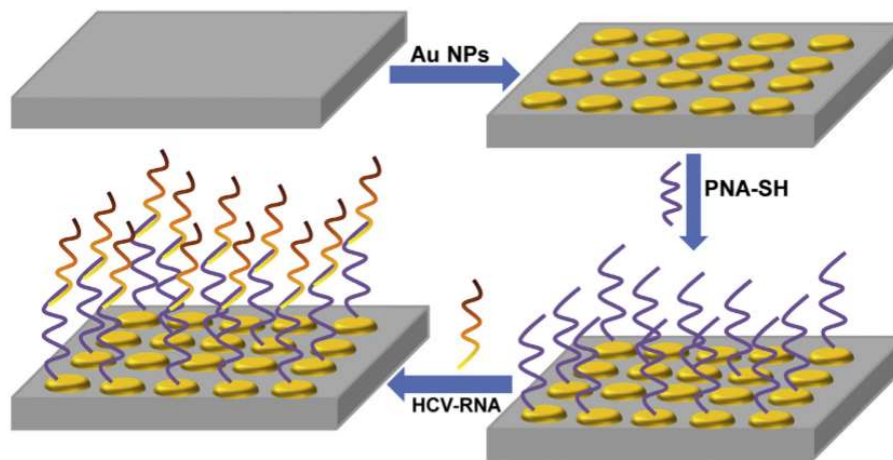
El presente trabajo muestra el desarrollo de un nuevo y rápido biosensor del VHC altamente selectivo y sensible para la detección temprana del ARN del VHC extraído de muestras clínicas. El biosensor basado en el VHC fue construido con la fabricación de sustratos de nanodots de oro/óxido de estaño e indio y seguido de la inmovilización de un ácido peptidonucleico específico (como bio-receptor) y terminado con un grupo tiol sobre nanodots de oro/óxido de estaño e indio. El principio de desarrollo del biosensor fue basado en la hibridación selectiva entre el ácido peptidonucleico y el ARN del VHC de regiones no traducidas (5'-UTR). La espectroscopia Raman y las técnicas de voltametría de ondas cuadradas fueron utilizadas para monitorizar la interacción entre el ARN del VHC y el ácido peptidonucleico.

La solución de moléculas de APN-SH fueron autoensambladas e inmovilizadas en las nanoestructuras de oro del sustrato ITO, en las cuales el APN-SH fue disuelto en etanol y los sustratos de oro modificados con ITO fueron sumergidos en la disolución de APN-SH. Las moléculas de APN no inmovilizadas fueron retiradas lavando el sustrato y secadas bajo corriente de nitrógeno. La inmovilización del APN fue confirmada usando técnicas de espectroscopia Raman y voltametría de ondas cuadradas (SWV). El Au/ITO con el APN-SH fueron sumergidos en la solución diana complementaria de ARN preparada en 10 mM de PBS durante 1 hora. La monitorización de la reacción de hibridación entre las moléculas de APN y la diana complementaria de ARN-VHC se llevó a cabo mediante comparación de los espectros Raman mediante espectrometría Raman, así como cambios en los voltamperogramas obtenidos mediante voltametría de ondas cuadradas (SWV).

El principio de desarrollo del biosensor de ARN-VHC basado en APN se relacionó con los siguientes factores. El genoma del VHC está compuesto de 9600 bases que contienen dos regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) a ambos extremos, las secuencias de estas UTRs son específicas para cada virus (5'-GGAGAUUUGGGCGUG-3'); la secuencia de las UTRs pueden diferenciar mARNs. Además, en la 5'-UTR, hay un sitio de entrada ribosomal interno (IRES), que es una de las regiones más conservadas en el genoma completo del VHC. En el presente trabajo, se utilizó un APN complementario con bases de secuencia 5'-CACGCCCAAATCTCC-3' y terminadas con un grupo tiol para permitir su inmovilización directa en las nanoestructuras de Au/sustrato ITO. Los APN/nanoestructuras de Au/ITO fueron utilizadas como receptor para la hibridación con la diana de ARN-VHC como se muestra en el Esquema 2. Las

estructuras químicas y la pureza de este péptido fueron confirmadas utilizando técnicas de espectroscopía de masa y HPLC.

W.A. El-Said, J. Choi / Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 217 (2019) 288–293



Esquema 2. Desarrollo del biosensor de ARN-VHC, paso 1: Fabricación de las nanoestructuras de oro modificadas con sustrato ITO; paso 2: inmovilización de los APN-SH en los nanodots de oro modificados con sustrato ITO; y paso 3: detección de la diana complementaria ARN-VHC.

Aquí, como se muestra en la Figura 6a, el voltamograma cíclico del APN-SH inmovilizado en la superficie de las nanoestructuras de Au modificadas con sustrato ITO, mostró una respuesta irreversible con un pico anódico de cerca de 0,5 V. Una vez hibridado el ARN-VHC con el APN, se observaron dos nuevos picos en los voltamogramas además de un cambio del pico anódico del APN. Estos nuevos picos podrían utilizarse para monitorizar las diferentes concentraciones del ARN-VHC. La técnica de voltametría de onda cuadrada fue utilizada para monitorizar las diferentes concentraciones del ARN-VHC como se muestra en la Figura 6b, que indican un incremento del pico anódico con el aumento en la concentración del ARN-VHC. La Figura 6c mostró una relación entre el pico anódico y la concentración del ARN-VHC con un rango desde 1×10^3 UI/mL hasta 20×10^3 UI/mL, en las cuales ilustran que el valor de oxidación del pico muestra un incremento lineal ($R^2=0,998$) con la concentración del ARN-VHC. El límite de detección del sensor de VHC fabricado basado en la SWV fue de 101,5 UI/mL, el cual se encuentra en el rango normal para la investigación de la infección por VHC y más bajo que el nivel de VHC en suero después de la terapia (más de 600 UI/mL); así, este LOD es suficiente para discernir la infección en suero por muestras clínicas. Sin embargo, se deberían mejorar las propiedades analíticas obtenidas para la detección de infecciones tempranas por VHC.

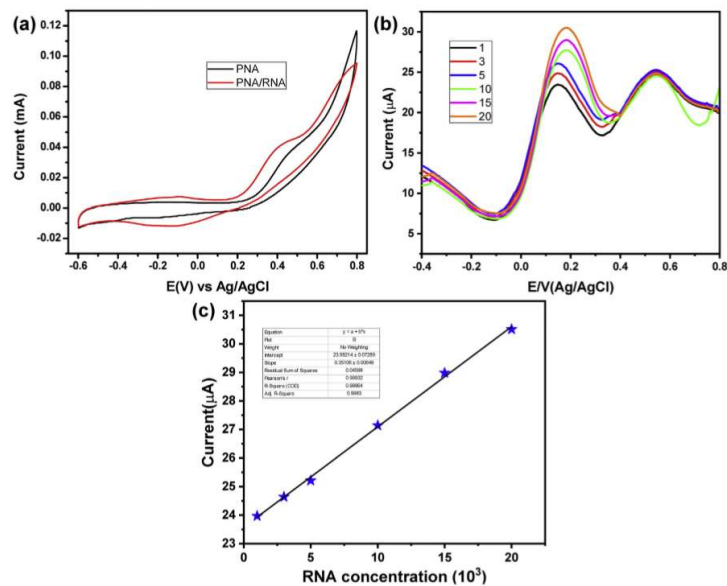


Figura 6. (a) Voltamogramas cíclicos del APN-SH inmovilizado en las nanopartículas modificadas en las nanoestructuras de oro con el ARN-VHC hibridado con APN, (b) voltamogramas de ondas cuadradas a diferentes concentraciones de ARN-VHC tras la hibridación con APN y (c) relación entre el actual pico y las concentraciones de ARN-VHC dentro del rango de concentraciones desde 1×10^3 UI/mL hasta 20×10^3 UI/mL.

A modo de conclusión, se ha desarrollado un biosensor electroquímico de gran selectividad para la detección del ARN del Virus de la Hepatitis C (VHC), con un límite de detección de 101,5 UI/mL y un intervalo lineal de 1×10^3 UI/mL hasta 20×10^3 UI/mL.

5. CONCLUSIONES

Con todos los estudios que se han realizado a lo largo de estos últimos años, se puede concluir que los biosensores electroquímicos utilizando los ácidos peptidonucleicos (APNs) como sondas de marcaje para la detección de múltiples dianas, son dispositivos analíticos idóneos desde el punto de vista analítico y biomolecular.

Desde un punto de vista analítico, caben resaltar las propiedades analíticas más relevantes de los biosensores electroquímicos como son su elevada especificidad, buena exactitud, precisión y reproducibilidad, alta sensibilidad, simplicidad, bajo coste, así como posibilidad de miniaturización y automatización.

Desde el punto de vista molecular, los APNs poseen una serie de ventajas respecto al ADN como sondas: tales como la hibridación con gran afinidad y especificidad con los ácidos nucleicos debido a su carga eléctrica neutra, mayor resistencia a la degradación mediada por endonucleasas, elevada estabilidad térmica y química, además de dependencia casi nula de la fuerza iónica.

Todo esto tiene un alto potencial para el diagnóstico precoz de múltiples patologías de especial relevancia.

El futuro de estos dispositivos se centrará en el diseño y desarrollo de dispositivos analíticos más sensibles y con menor límite de detección, que permitan la detección de analitos incluso a niveles cuantitativos casi indetectables.

Bibliografía

1. Lowe CR. Biosensors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1989;324(1224):487-96.
2. Gokulrangan G, Unruh JR, Holub DF, Ingram B, Johnson CK, Wilson GS. DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy. *Anal Chem.* 2005;77(7):1963-70
3. Potyrailo RA, Conrad RC, Ellington AD, Hieftje GM. Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal Chem.* 1998;70(16):3419-25.
4. Savran CA, Knudsen SM, Ellington AD, Manalis SR. Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules. *Anal Chem.* 2004;76(11):3194-8.
5. Burgstaller P, Jenne A, Blind M. Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002;5(5):690-700.
6. Niemeyer CM. The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates. *Trends Biotechnol.* 2002;20(9):395-401.
7. Niemeyer CM. Semi-synthetic DNA-protein conjugates: novel tools in analytics and nanobiotechnology. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 1):51-3.
8. Rechnitz GA, Ho MY. Biosensors based on cell and tissue material. *J Biotechnol.* 1990;15(3):201-17.
9. Candido EP, Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *Trends Biotechnol.* 1996;14(4):125-9.
10. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(1-2):121-31.
11. Grundler P. Chemical sensors: An introduction for scientists & engineers. In *Chemical Sensors*. Ed. Springer Berlin Heidelberg. 2007.
12. Turner APF. Applications of direct electron transfer bioelectrochemistry in sensors and cell. 1983
13. Cass AE, Davis G, Francis GD, Hill HA, Aston WJ, Higgins IJ, et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal Chem.* 1984;56(4):667-71.
14. Koncki R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Anal Chim Acta.* 2007;599(1):7-15.
15. Lee J, Park IS, Kim H, Woo JS, Choi BS, Min DH. BSA as additive: A simple strategy for practical applications of PNA in bioanalysis. *Biosens Bioelectron.* 2015;69:167-73
16. Ryoo SR, Lee J, Yeo J, Na HK, Kim YK, Jang H, et al. Quantitative and multiplexed microRNA sensing in living cells based on peptide nucleic acid and nano graphene oxide (PANGO). *ACS Nano.* 2013;7(7):5882-91.
17. Kotikam V, Fernandes M, Kumar VA. Comparing the interactions of DNA, polyamide (PNA) and polycarbamate nucleic acid (PCNA) oligomers with graphene oxide (GO). *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(43):15003-6.
18. Guo S, Du D, Tang L, Ning Y, Yao Q, Zhang GJ. PNA-assembled graphene oxide for sensitive and selective detection of DNA. *Analyst.* 2013;138(11):3216-20.
19. Park JS, Baek A, Park IS, Jun BH, Kim DE. A graphene oxide-based platform for the assay of RNA synthesis by RNA polymerase using a fluorescent peptide nucleic acid probe. *Chem Commun (Camb).* 2013;49(80):9203-5.
20. Lee J, Park IS, Jung E, Lee Y, Min DH. Direct, sequence-specific detection of dsDNA based on peptide nucleic acid and graphene oxide without requiring denaturation. *Biosens Bioelectron.* 2014;62:140-4.
21. Pournaghi-Azar MH, Ahour F, Hejazi MS. Direct detection and discrimination of double-stranded oligonucleotide corresponding to hepatitis C virus genotype 3a using an electrochemical DNA biosensor based on peptide nucleic acid and double-stranded DNA hybridization. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(8):3581-7.

22. M. S. Hejazi, M. H. Pournaghi-Azar, E. Alipour, E. D. Abdolahinia, S. Arami, H. Navvah. Development of a Novel Electrochemical Biosensor for Detection and Discrimination of DNA Sequence and Single Base Mutation in dsDNA Samples Based on PNA-dsDNA Hybridization - a new Platform Technology, *Electroanalysis*. 2011;23: 503-511.
23. Fang Z, Kelley SO. Direct electrocatalytic mRNA detection using PNA-nanowire sensors. *Anal Chem*. 2009;81(2):612-7.
24. Jolly P, Batistuti MR, Miodek A, Zhurauski P, Mulato M, Lindsay MA, et al. Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection. *Sci Rep*. 2016;6:36719.
25. Deng H, Shen W, Ren Y, Gao Z. A highly sensitive microRNA biosensor based on hybridized microRNA-guided deposition of polyaniline. *Biosens Bioelectron*. 2014;60:195-20
26. Macanovic A, Marquette C, Polychronakos C, Lawrence MF. Impedance-based detection of DNA sequences using a silicon transducer with PNA as the probe layer. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(2):e20.
27. Das J, Ivanov I, Montermini L, Rak J, Sargent EH, Kelley SO. An electrochemical clamp assay for direct, rapid analysis of circulating nucleic acids in serum. *Nat Chem*. 2015;7(7):569-75.
28. Das J, Ivanov I, Sargent EH, Kelley SO. DNA Clutch Probes for Circulating Tumor DNA Analysis. *J Am Chem Soc*. 2016;138(34):11009-16.
29. Hejazi MS, Pournaghi-Azar MH, Ahour F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. *Anal Biochem*. 2010;399(1):118-24.
30. M.H.M, Zaid, J. Abdullah, N.A. Yusof, Y. Sulaiman, H. Wasoh, M.F.M. Noh, R. Issa. PNA biosensor based on reduced graphene oxide/water soluble quantum dots for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *Sensor. Actuator. B Chem*. 2017;241:1024-1034.
31. X. Liu, X. Qu, H. Fan, S. Ai, R. Han. Electrochemical detection of DNA hybridization using a water-soluble branched polyethyleneimine-cobalt(III)-phenanthroline indicator and PNA probe on Au electrodes, *Electrochim. Acta*. 2010;55:6491-6495.
32. Bala A, Górski Ł. Peptide nucleic acid as a selective recognition element for electrochemical determination of Hg²⁺. *Bioelectrochemistry*. 2018;119:189-95.
33. N. Prabhakar, P. R. Solanki, A. Kaushik, M. Pandey, B. Malhotra. Peptide Nucleic Acid Immobilized Biocompatible Silane Nanocomposite Platform for *Mycobacterium tuberculosis* Detection, *Electroanalysis*. 2010;22:2672-2682.
34. K. Kerman, Y. Matsubara, Y. Morita, Y. Takamura, E. Tamiya. Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, *Sci. Technol. Adv. Mater*. 2004;5:351-357.
35. J. B. Raoof, R. Ojani, S.M. Golabi, E. Hamidi-Asl, M.S. Hejazi. Preparation of an electrochemical PNA biosensor for detection of target DNA sequence and single nucleotide mutation on p53 tumor suppressor gene corresponding oligonucleotide, *Sensor. Actuator. B Chem*. 2011;157:195-201.
36. Sforza S, Corradini R, Tedeschi T, Marchelli R. Food analysis and food authentication by peptide nucleic acid (PNA)-based technologies. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):221-32.
37. Teengam P, Siangproh W, Tuantranont A, Henry CS, Vilaivan T, Chailapakul O. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. *Anal Chim Acta*. 2017;952:32-40.
38. El-Said WA, Choi JW. High selective spectroelectrochemical biosensor for HCV-RNA detection based on a specific peptide nucleic acid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2019;217:288-93.