



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS EN LA
DETECCIÓN DE microARN EN CÁNCER**

Autor: Marta Mahon Helguero

Fecha: Julio 2019

Tutor: Marta Sánchez-Paniagua López

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cáncer.....	3
1.2 Biomarcadores del cáncer.....	4
1.3 Métodos analíticos.....	7
1.4 Sensores electroquímicos	8
OBJETIVOS.....	9
METODOLOGÍA	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
CONCLUSIONES	15
BIBLIOGRAFÍA.....	16

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y conlleva grandes repercusiones a la sociedad. La tasa de supervivencia depende en gran medida de la etapa en la que se detecta el cáncer y, por lo tanto, el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz contra el cáncer son fundamentales. Recientemente, de la necesidad de diseñar y desarrollar dispositivos de detección altamente sensibles para identificar a las personas con tumores malignos, ha surgido un creciente interés en los biosensores electroquímicos de ADN. Estos nuevos dispositivos cubren algunas de las limitaciones que presentan los métodos de detección convencionales al presentar un rendimiento analítico superior y mayor especificidad, proporcionando un diagnóstico clave, especialmente en las primeras etapas de la carcinogénesis, de manera sensible, rápida y de bajo coste.

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

En el siglo XIX la enfermedad del cáncer ya no es sinónimo de muerte segura, los grandes avances gracias a la investigación sin tregua de nuevas dianas terapéuticas para combatir los tumores y su reproducción han significado un cambio de perspectiva hacia la enfermedad. Sin embargo, el cáncer sigue siendo la segunda enfermedad con mayor prevalencia mundial, casi una de cada seis muertes se debe al cáncer, con más de 1.500 muertes al día y más de 200 tipos de cáncer identificados¹. Además de los efectos devastadores para los pacientes y sus familias, los costes económicos son enormes, tanto en recursos de atención médica para su tratamiento, como en la pérdida de capital humano debido a la mortalidad precoz².

A pesar del continuo descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer el avance de las nuevas tecnologías para su diagnóstico precoz es lento¹. La mayoría de las personas tienen la enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico y esto reduce drásticamente el tiempo de supervivencia^{2,3}, el cual varía enormemente en función de la localización y el estado del cáncer. Por el contrario, la supervivencia es relativamente buena cuando los cánceres se diagnostican en una etapa temprana, porque los tratamientos establecidos se pueden aplicar a tiempo cuando son más efectivos³. Por consiguiente, un buen cribado y detección temprana del cáncer son importantes para reducir las consecuencias del cáncer en pacientes diagnosticados una vez el proceso de carcinogénesis este avanzado y suponga un peor pronóstico debido a las limitaciones de diagnóstico y tratamiento¹.

Bajo el término de cáncer se engloba un gran grupo de enfermedades que cursan con el crecimiento anormal de células superando los límites habituales. Esta enfermedad genética tiene múltiples etapas: comienza a partir de alteraciones en la expresión de genes o proteínas debido a cambios genéticos y epigenéticos que afectan al ciclo de crecimiento celular que se traduce en fenotipos tumorales⁴. Estos cambios genéticos incluyen la inactivación de los genes supresores de tumores, activación de oncogenes, cambios cromosómicos, hipermetilación de genes, etc¹. La acumulación secuencial de alteraciones genéticas en varias etapas en una sola célula altera la expresión de los genes que modulan las vías de crecimiento y apoptosis⁴ como se muestra en la figura 1. Estos cambios genéticos además de los factores ambientales (como el estilo de vida, la dieta y la exposición a la radiación ultravioleta o a contaminantes cancerígenos) interactúan para influir en el desarrollo del tumor². Este tumor o neoplasia puede ser maligno o benigno en función de la agresividad de su crecimiento y de su propagación a otras partes del cuerpo mediante un proceso conocido como metástasis.

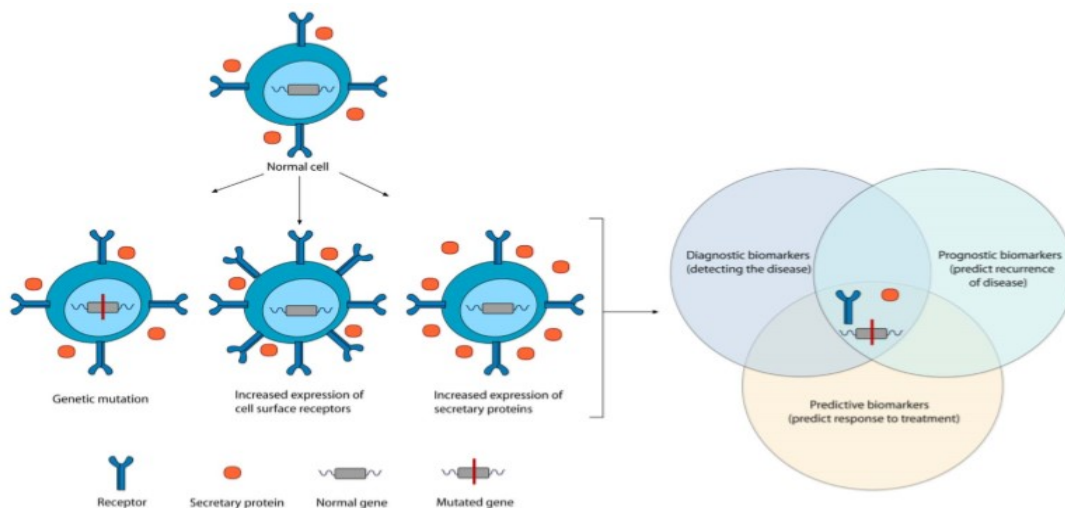


Fig. 1. Alteraciones moleculares del cáncer¹

La detección temprana y precisa del cáncer es muy importante para el diagnóstico clínico, el monitoreo de la toxicidad y, sobretudo, para el éxito del tratamiento de los cánceres². Un inconveniente del diagnóstico del cáncer es la falta de síntomas en los inicios de la enfermedad³.

1.2 Biomarcadores del cáncer

Uno de los principales objetivos de la investigación oncológica es el estudio de los cambios en el genoma y alteraciones morfológicas dando lugar a las diferencias entre las células normales y neoplásicas. Estos cambios actúan como marcadores tumorales⁵. Por tanto, un marcado tumoral o biomarcador es una sustancia o actividad producida o inducida por una

célula neoplásica que puede medirse y evaluarse objetivamente como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patógeno o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica². De tal manera, que nos informan sobre la presencia, evolución y respuesta al tratamiento del tumor. Los biomarcadores están presentes en los tejidos tumorales o en el suero y abarcan una amplia variedad de moléculas, entre las que se incluyen el ADN, el ARNm, el microARN, las enzimas, los metabolitos, los factores de transcripción y los receptores de la superficie de las células^{1,2} (Figura 2). Entre estas moléculas, los biomarcadores basados en moléculas de ácido nucleíco son de gran importancia, ya que el desarrollo de la biología en las últimas décadas ha demostrado que, además de constituir el material hereditario para codificar la información genética, son candidatos ideales para reconocer una variedad de bioanalitos como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Esto se debe a su facilidad de detección mediante el emparejamiento de bases con sondas complementarias de ácido nucleíco⁵. La detección de estos biomarcadores ayuda al diagnóstico precoz del cáncer, incluso cuando no hay signos físicos de cáncer¹.

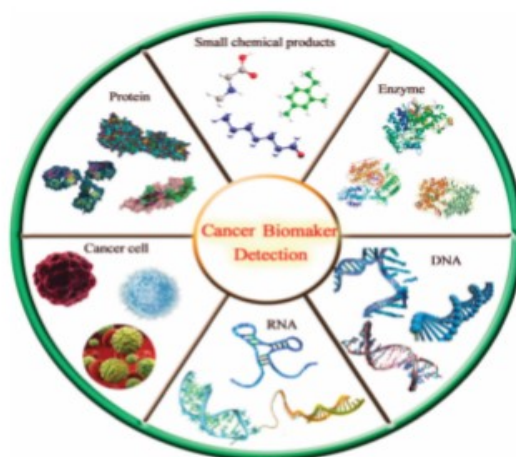


Fig 2. Biomarcadores del cáncer².

Los biomarcadores del cáncer tienen una concentración alterada en condiciones cancerosas que en condiciones normales. La fuerte relación con la progresión del tumor ayudará a entender el tiempo y el tipo de intervención correcta⁴. Se clasifican en tres categorías según la información que proporcionen: *biomarcadores de diagnóstico*: relacionados con la detección de la enfermedad; *biomarcadores de pronóstico*: información prospectiva de la evolución del paciente y poder guiar las decisiones terapéuticas; y *biomarcadores predictivos*: estiman la probabilidad de respuesta tumoral a un tratamiento terapéutico⁶.

1.2.1. MicroARN circulante como biomarcadores del cáncer

En los últimos años, ha quedado claro que las alteraciones en la expresión de microARN (miARN) contribuyen a la patogénesis de la mayoría de las neoplasias malignas humanas siendo poco claro si estos cambios de niveles de expresión de miARN son la causa o la consecuencia del cáncer. La revisión de la literatura actual sugiere que los miARNs circulantes podrían constituir una clase ideal de biomarcadores para la detección de cáncer basada en sangre ya que su expresión es frecuentemente desregulada en el cáncer, los modelos de expresión de miARN en esta enfermedad parecen ser específicos de tejido⁷, presentan una alta estabilidad en sangre y por ello se podrían obtener por muestras de sangre lo que supone una mínima invasión⁸. Los miARN son pequeñas moléculas de ARN no codificante (una longitud de 19-25 nucleótidos) que van a participar en la regulación de la expresión génica y traducción de proteínas clave en procesos celulares en una amplia gama de animales, plantas y virus⁸. Para ello, forman un complejo de silenciamiento inducido por ARN con un objetivo específico dentro del ARN mensajero (ARNm) mediante una combinación no perfecta de seis a ocho nucleótidos, ya sea induciendo degradación o el silenciamiento de la traducción de sus ARNm objetivo⁹. Su creciente interés como biomarcadores tumorales frente al ADN o ARNm, se debe a que presentan una mejor capacidad para predecir el cáncer puesto que una sola molécula de miARN es capaz de regular a más de cien ARNm (más de un 30% del total¹⁰), por tanto proporcionan la información del pronóstico de mayor órdenes de magnitud⁴. Por tanto participan en el control de procesos celulares como el crecimiento, diferenciación y muerte, que están desregulados en cáncer ya sea por aumento o descenso, señala su implicación en la carcinogénesis. Estos miARNs no sólo sirven como indicadores de varios aspectos de la carcinogénesis y el desarrollo tumoral, sino que también proporcionan fuentes importantes para el desarrollo de tratamientos y terapias contra el cáncer basadas en el miARN⁸. Son interesantes como marcadores tumorales por su alta estabilidad en sangre y otros fluidos, ya que su corta longitud le hace menos vulnerable a las ribonucleasas⁹. Al encontrarse en los fluidos corporales tanto en la sangre, como en la orina y saliva, servirían como biomarcadores para métodos de diagnóstico no invasivo además de su especificidad tisular. La biogénesis de los miARN ha sido ampliamente estudiada y se resume en la Figura 3.

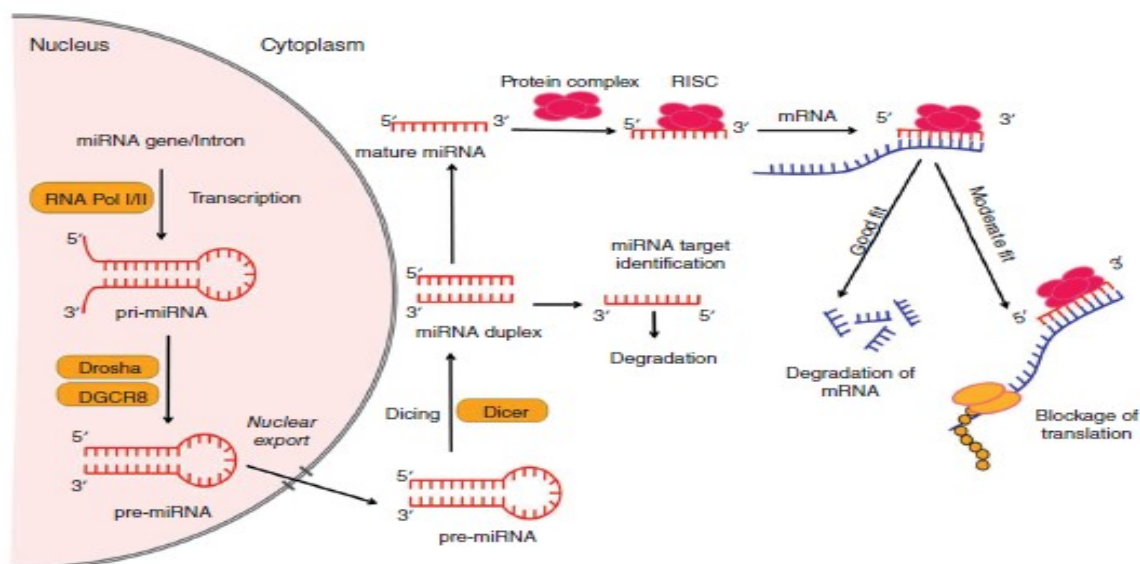


Fig. 3: Proceso de biogénesis de miARN en la célula y su implicación en el silenciamiento de ARNm⁸.

1.3 Métodos analíticos

Las técnicas comunes para detectar biomarcadores basados en la detección de proteínas y basados en ácidos nucleicos son: el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estas técnicas a pesar de ser eficientes y robustas, tienen limitaciones tecnológicas como falta de precisión, de sensibilidad y especificidad para aplicaciones de diagnóstico clínico² además de otras desventajas como la detección lenta y elevado coste de los reactivos utilizados en cada ensayo^{4,15}. Además al ser manuales carecen de la posibilidad de realizar una monitorización continua del paciente durante el tratamiento¹. Otro aspecto a tener en cuenta, es la posibilidad de poder detectar varios biomarcadores, puesto que el cáncer es una enfermedad multifactorial asociada a múltiples eventos en la célula¹.

Además de las técnicas basadas en biomarcadores existen otros métodos convencionales para el diagnóstico del cáncer: ultrasonido, imagen por resonancia magnética, rayos X, tomografía de emisión de positrones y biopsia. Estas son ineficientes para la detección precoz del neoplasma ya la mayoría de estas tecnologías están basadas en criterios morfológicos¹² dependientes de propiedades fenotípicas del tumor². Además presentan importantes obstáculos: son relativamente lentas, laboriosas, demandan mucho tiempo, requieren una maquinaria sofisticada convirtiéndolos en caros y de bajo rendimiento¹².

En consecuencia a estas limitaciones, la meta para el diagnóstico clínico del cáncer consiste en desarrollar una técnica analítica con mayor especificidad y sensibilidad por los biomarcadores a la vez que afrontar los inconvenientes de las anteriores, al ser de menor coste, mayor rapidez y adaptable a diferentes marcadores¹.

1.4 Sensores electroquímicos

Recientemente, a causa de la necesidad de diseñar y desarrollar materiales altamente sensibles y dispositivos de detección para identificar a las personas con tumores pre-malignos y pre-metastásicos, ha surgido un creciente interés en los biosensores¹². Un biosensor es un dispositivo analítico que integra un elemento de reconocimiento biológico en un transductor dando una señal cuantificable proporcional a la cantidad de analito en la muestra. Dependiendo de la naturaleza del transductor los biosensores se clasifican en electroquímico, óptico, piezoeléctrico y termométrico¹². Entre ellos, los biosensores electroquímicos son los más adecuados en el contexto de la aplicación biomédica, debido a su enorme potencial, ya que constituyen un ejemplo de sensor de alta especificidad para medir niveles extremadamente bajos de marcadores para detectar las alteraciones en las primeras etapas de la enfermedad¹³. Constan principalmente de dos partes: un elemento receptor que reconoce el analito que se quiere detectar y otro elemento transductor encargado de transformar este fenómeno biológico en una señal eléctrica^{14,16} por medio de reacciones químicas que consumen electrones generando un potencial electroquímico. Esta señal es fácilmente procesable por sistemas electrónicos (Figura 4).

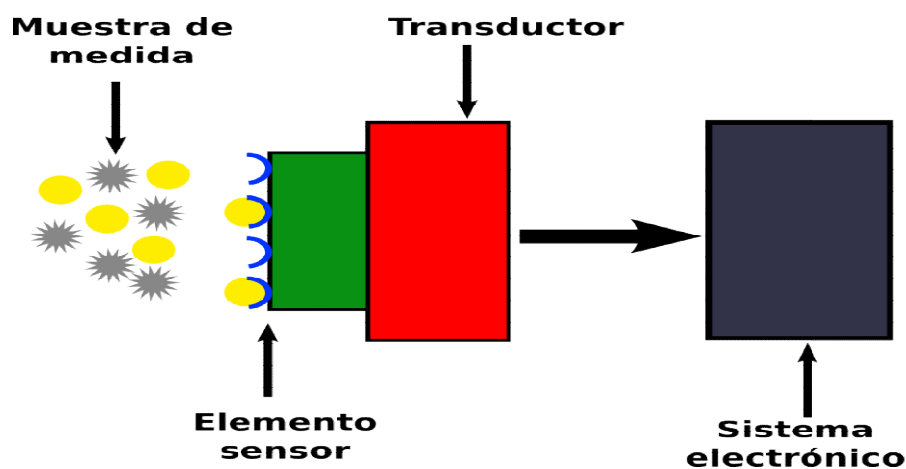


Fig 4. Estructura básica de un biosensor electroquímico

Gracias a su versatilidad pueden identificar una variedad de biomoléculas con gran especificidad, sensibilidad y mayor rapidez en obtener resultados al reducir el número de etapas en el procedimiento de detección respecto a otras técnicas convencional lo que supone una simplificación.

Los biosensores para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos o genosensores utilizan como elemento de reconocimiento una secuencia de oligonucleótidos complementaria a la secuencia que pretendemos determinar y que, en nuestro caso, es el analito, y se fundamenta en la conversión del proceso de hibridación en una señal medible

(Figura 5). En este caso, el acontecimiento biológico es una hibridación selectiva de las secuencias de oligonucleótidos con bases complementarias¹⁷. Se trata de un candidato prometedor debido a sus características analíticas como son alta sensibilidad y especificidad, bajos límites de detección, tiempo de análisis corto, bajo coste, además, permiten realizar análisis en tiempo real, pudiendo ser automatizados y miniaturizados.

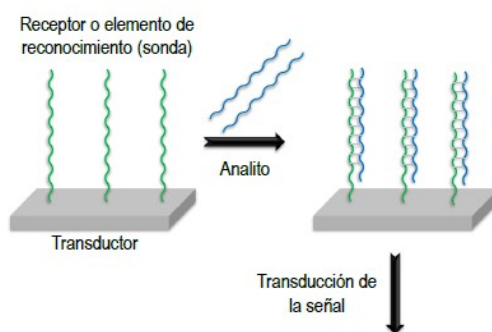


Figura 5: Reacción de hibridación del elemento de reconocimiento con el analito y transducción de la señal.

OBJETIVOS

Dada la importancia del diagnóstico de cáncer a tiempo para permitir que el tratamiento sea efectivo este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica de biosensores electroquímicos diseñados para detectar miARNs como biomarcadores del cáncer con el objetivo de conocer la evolución, regresión y respuesta a la terapia farmacológica.

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en revistas que se encuentran recogidos en diversas bases de datos como Elsevier, Science Direct y PubMed.

Las palabras clave usadas para realizar la búsqueda han sido: electrochemical biosensor, cáncer, genosensor, biosensor, microARN.

Se ha realizado una búsqueda de artículos en español e inglés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente para la detección de miARN relacionados con el cáncer se utilizan técnicas de Northern Blot y PCR a tiempo real, no obstante estas técnicas son caras y laboriosas y de baja sensibilidad en el caso de Northern Blot. Teniendo en cuenta la importancia de un diagnóstico precoz para aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer, un método de detección temprano es un reto que debe desarrollarse. En la búsqueda de un método simple, de bajo coste, de mayor sensibilidad, fiable y detección rápida aparecen los biosensores electroquímicos, de uso rutinario. Además los pasos experimentales carecen de toxicidad. Es decir estos dispositivos portátiles presentan ventajas y propiedades atractivas para su desarrollo. Sin embargo, a día de hoy, los biosensores deben afrontar los retos que presentan las características de miARN, como son las longitudes cortas y las secuencias muy similares entre los miembros de la familia miARN, que complican la etapa del diseño de la sondas de oligonucleótidos en el desarrollo del biosensor. Se han estudiado diversos tipos de sondas de captura complementarias al miARN a determinar, siendo las más utilizadas sondas de ADN^{18, 19}, sondas de ARN²⁰ y sondas de APN^{21,22}. Entre ellas se destacan los APN que son ácidos peptidónucleicos 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. Su interés como sonda de captura se debe a que los híbridos APN/ADN tienen mayor estabilidad térmica que los ADN/ADN como consecuencia del esqueleto neutro de los APN.

Para la detección selectiva de miARN a través de la hibridación, los retos que presentan los miARN, ya mencionados, dificultan el desarrollo de métodos de hibridación tipo sándwich (que hacen uso de una tercera sonda de oligonucleótidos, denominada sonda indicadora o señalizadora) ya que resulta difícil marcar la sonda de oligonucleótidos y diseñar longitudes correctas de sonda de captura e indicadora.

Respecto a los métodos de detección se pueden dividir en dos grandes grupos, *métodos que requieren el uso de marcas electroquímicas* y *métodos libres de marcaje*. Considerando los métodos que requieren marcaje, se han diseñado biosensores electroquímicos para la detección de microARN basados en microARNs marcados con moléculas electrocatalíticas²³ y basados, mayoritariamente, en el uso de nanopartículas funcionalizadas o marcadas^{24,25,26}. Los métodos sin marcaje suponen una alternativa muy interesante debido a que se evitan los

protocolos laboriosos y los reactivos costosos usualmente envueltos en los sensores que requieren marcadores electroquímicos. Se han desarrollado biosensores para la detección de microARN en cáncer que hacen uso de la detección directa del ARN mediante la medida de la oxidación de las bases nucleotídicas¹⁵ o mediante el uso de moléculas redox^{19,27}.

En la tabla 1 se muestran algunos de los genosensores electroquímicos de miARN relacionados con el cáncer, desarrollados para su detección. A continuación se explicarán con detalle dos ejemplos elegantes de estos biosensores, seleccionados por sus características analíticas y por su metodología de detección.

Tabla 1: Genosensores electroquímicos desarrollados para la detección de miARNs.

Metodología	Técnica electroquímica	miARN	Intervalo lineal (μM)	Tiempo de ensayo (h)	Referencia
Sensor, basado en nanopartículas de oro, combinado: hibridación, unión de proteína p19 y desplazamiento de p19	Voltametría de onda cuadrada	miARN-21 miARN-32 miARN-132	10^{-11} - 1	7	<i>Labib y col. (2013)</i> ²⁸
Sensor basado en nanopartículas de oro y un sistema de triple amplificación	Voltametría y Amperometría	miARN-21	10^{-7} - 7×10^{-5}	147	<i>Yin y col. (2012)</i> ²⁹
Bioensayo magnético basado en microesferas	Voltametría de pulso diferencial	miARN-522	0,01- 0,2	1,2	<i>Bartosik y col. (2014)</i> ³⁰
Plataformas magnetobiológicas desechables basadas en p19	Amperometría	miARN-21	$1,4 \times 10^{-4}$ - 10^{-2}	2,3	<i>Campuzano y col. (2014)</i> ³¹

Detección sin etiqueta AgNPs intercalados en polianilina y grafeno	Voltametría	miARN-21	1×10^{-8} - 10	0,5	<i>Salahandisha y col. (2018)</i> ³²
Nanobiosensor basado en óxido de grafito y óxido de oro	Voltametría	miARN-155	2×10^{-9} - 8×10^{-6}	0,5	<i>Azimzadeh y col. (2016)</i> ³³
Sensor con amplificación enzimática mediada por endonucleasa	Voltametría de onda cuadrada	miARN-21	1×10^{-10} - 0,001	1	<i>Miao y col. (2015)</i> ³⁴

Detección electroquímica de tres modos de niveles ultra bajos de microARN

En este trabajo, *Labib y col.*²⁸ desarrollaron un sensor electroquímico basándose en las propiedades únicas de unión de la proteína p19 para la detección y cuantificación de niveles ultra bajos de miARN 21 en un amplio rango dinámico de concentraciones. Esta proteína de fusión de 19kDa, pertenece al Tombusvirus de la mancha anular de clavel italiano (del inglés *Carnation Italian Ringspot Virus, CIRV*) y actúa como supresor de la vía de silenciamiento de ARN. Esta proteína se une específicamente a los miARNs, una vez hibridados con su cadena complementaria, con afinidad nanomolar de manera independiente de la secuencia y con selectividad de tamaño. Una característica fundamental es que la proteína p19 no interactúa con ARN de cadena simple o ADN de cadena simple o doble. La especificidad de unión de los p19 a 20-23 pares de bases de doble cadena de ARN (dsARN) y los contactos intermoleculares directos/mediados por el agua entre la proteína de fusión y el miARN permiten la detección de la estructura híbrida miARN-antimiARN³⁵. La interacción entre la cadena fosfato-azúcar o 2' OH de la doble hélice de ARN y p19 ocurre ya sea electrostáticamente o a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La capacidad de p19 para acomodar la doble cadena de ARN podría atribuirse a la plasticidad estructural de las hélices que contiene el p19³⁶.

Este sensor combinado acopla tres modalidades de detección basadas en hibridación (H-SENS), unión de proteínas p19 (P-SENS) y desplazamiento de proteínas (D-SENS).

Para ello se emplea una sonda de ARN tiolada complementaria al miARN a detectar, la cual se unirá a un electrodo de carbono serigrafiado con nanopartículas de oro debido a la afinidad entre el oro y los grupos tioles (Figura 6a). La hibridación del miARN con su sonda complementaria inmovilizada en la superficie electródica provoca un aumento de la intensidad de la corriente, medida por voltamperometría de onda cuadrada (SWV) (Figura 6b).

La adición del homodímero p19 al híbrido de ARN formado amplifica la señal, ya que causa una gran disminución en la densidad de corriente y por lo tanto mejora el rango de detección por un fenómeno de apantallamiento en el electrodo (Figura 6c). Más aún, al añadir el miARN 200 y su sonda complementaria, se forma un nuevo híbrido, que al estar a mayor concentración que el anterior en la solución, provoca una disociación de la proteína p19 de su complejo formado anteriormente con el híbrido inmovilizado, desplazándose hacia el nuevo híbrido no tiolado, dando lugar, por lo tanto, a un aumento en la densidad de corriente (Figura 6d).

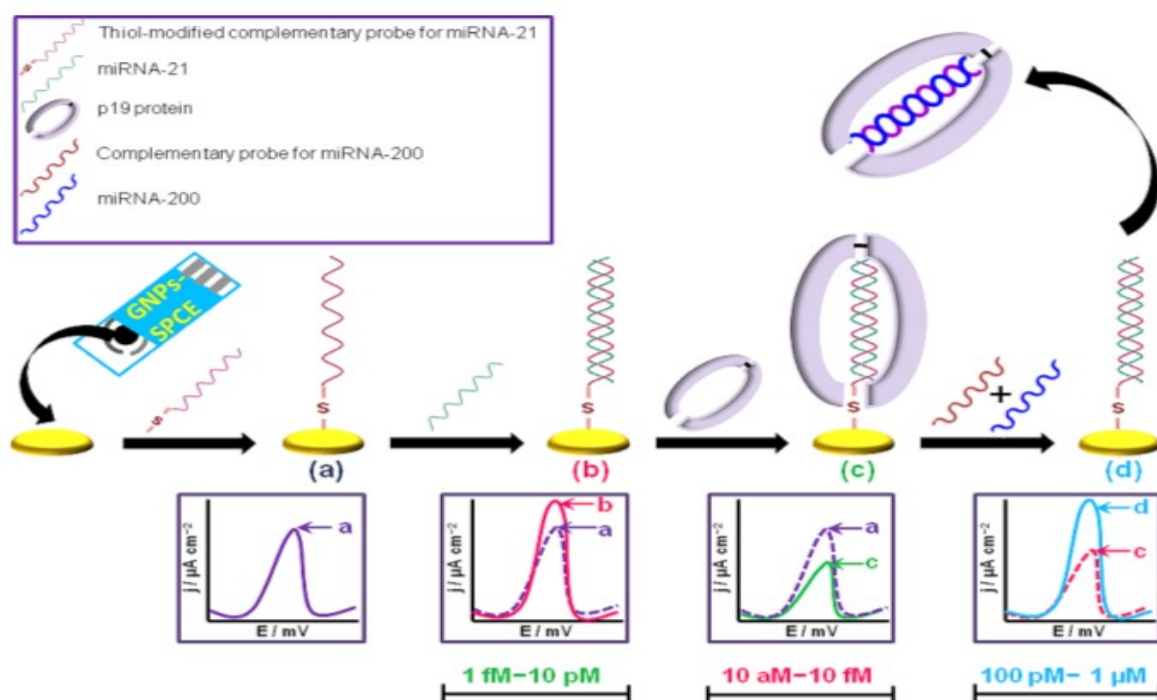


Figura 6: Sensor electroquímico para la detección de miRNAs basado en el uso de proteína p19²⁸

El sensor combinado HPD es adecuado para el análisis de múltiples miARNs en un solo electrodo de carbono serigrafiado con nanopartículas de oro modificadas, de bajo coste y disponible en el mercado. La voltamperometría de onda cuadrada (SWV) para el análisis de

miARN supone una técnica rápida con ventajas bien establecidas. Se alcanza un límite extremadamente bajo de detección hasta 90 moléculas de miARNs por 30 μL de muestra en un amplio rango dinámico de concentraciones de miARNs, de 11 órdenes de magnitud, que se extiende desde 1×10^{-11} μM hasta 1 μM , sin ningún tipo de etiqueta fluorescente o amplificación por PCR. Por tanto, este sensor de tres modalidades de detección exhibe alta selectividad y especificidad al tener unos límites de detección bajos y buena discriminación de las corrientes de fondo. El biosensor desarrollado también se utilizó en el análisis secuencial de miARN-32 y miARN-122 en un único electrodo. Además, el H-SENS puede reconocer miARNs con contenido de diferente de A/U y G/C y distinguir entre un miARN totalmente compatible y un miARN que comprende una mutación terminal o una mutación de base única intermedia. Además, el H-SENS y el P-SENS se emplearon con éxito para la detección directa y caracterización de tres miARNs endógenos en suero humano, miARN-21, miARN-32, y miARN-122, descritos como potentes biomarcadores de cáncer de próstata, colorrectal, de hígado y de mama. Estos resultados del sensor fueron validados por PCR a tiempo real.

Determinación de la hibridación de miARN mediante tres pasos de amplificación

Otro enfoque extraordinario, elaborado por *Yin y col.*²⁹ para la detección directa de la hibridación de miARN, específicamente miARN-21, sin etiquetas, plantea un biosensor basado en una triple amplificación de señal. Este biosensor está formado por un electrodo de carbono vitrificado (GCE) sobre el que se inmovilizan grafeno y nanoestructuras de oro dendrítico (DenAu) para mejorar la conductividad y el área efectiva de la superficie electroquímica. Gracias a la propiedades que confiere la adición de DenAu, se aumenta aún más la superficie efectiva del electrodo y, por lo tanto, tiene el potencial de anclar un mayor número sondas tioladas de ácido nucleico bloqueado (*del inglés, LNA Locked Nucleic Acid*) para amplificar la señal. El LNA, también conocido como ARN inaccesible, integra la molécula baliza, es decir la sonda de captura específica con forma de horquilla complementaria al miARN-21, que hibridan dejando el final de la sonda de captura libre.

A continuación, se adicionan al medio nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas, con varias cadenas de ADN biotiniladas y una cadena de LNA marcadora. Esta cadena de LNA marcadora hibrida con el fragmento no hibridado de la sonda de captura, de tal manera que se aumenta la cantidad de biotina inmovilizada. Seguidamente, para la amplificación de la señal, se utiliza conjugados enzimáticos de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Strp-HRP)

que se unirá a las sondas de ADN biotiniladas por medio del enlace de afinidad biotina-estreptavidina de alta afinidad, quedando de esta manera el enzima peroxidasa inmovilizada en la superficie del electrodo. De este modo se cataliza la reacción de oxidación de la hidroquinona por H_2O_2 para formar benzoquinona y mejorar la señal de reducción electroquímica de la benzoquinona. Este proceso se recoge en el esquema de la figura 7.

Gracias a estas amplificaciones, se alcanza un límite de detección de $10^{-7} \mu M$. Este biosensor altamente sensible y selectivo permitió el análisis directo y libre de PCR de la expresión de miARN-21 en el ARN total extraído de las células BEL-7402 del hepatocarcinoma humano, el quinto cáncer más común en todo el mundo, y la tercera causa más común de muerte por cáncer.

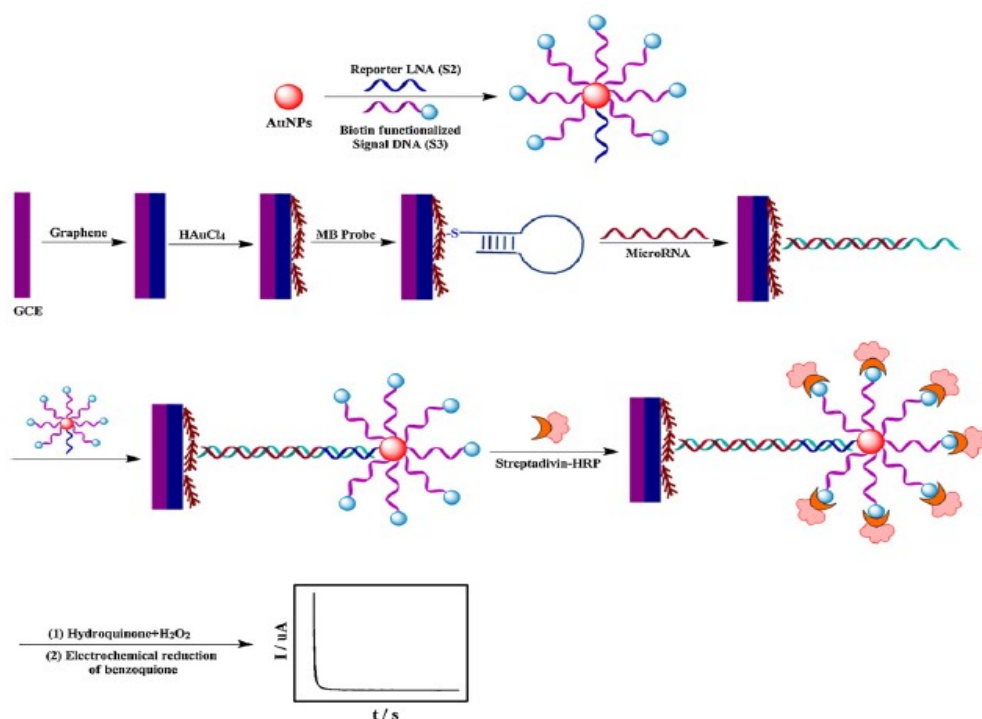


Figura 7: Determinación cronoamperométrica de la hibridación de miRNA mediante tres pasos de amplificación²⁷

CONCLUSIONES

El uso de miARNs como biomarcadores del cáncer se ha convertido en un atisbo de esperanza para el diagnóstico precoz de esta enfermedad mortal. Es por ello, que a pesar de que el campo de investigación de miARNs circulantes esté todavía en su etapa inicial, al ser moléculas de fácil acceso y relativamente estables en sangre, presentan un enorme potencial. Un método de detección eficaz para el perfilado no invasivo de miARN debería implicar

protocolos sencillos y rápidos, de alta sensibilidad y especificidad, con la cantidad mínima de muestra y bajo coste. Todas estas ventajas caracterizan a los biosensores electroquímicos, portátiles, desechables, con posibilidad de monitorización y miniaturización.

Los usos de los biosensores en la detección precoz, la monitorización y el estado del cáncer son claves prometedoras para un tratamiento eficaz, que reducirá la tasa de mortalidad de los pacientes. Sin embargo, todavía hay varios retos que deben ser abordados antes de que sean aceptados entre los métodos estándar actuales de PCR o Northernblotting. Antes de su aplicación para el diagnóstico clínico, estos prometedores enfoques basados en la nanotecnología deben ser validados críticamente para la sensibilidad predictiva y la selectividad.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Jayanthi, V.S.P.K.S.A., Das, A.B., Saxena, U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. (2017)

² Wu, L., Qu, X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chemical Society Reviews* 44, 2963–2997 (2015)

³ Peracaula, R., Barrabés, S. de Llorens. Altered Glycosylation in Tumours Focused to Cancer Diagnosis. *Disease Markers* 25, 207–218. (2013)

⁴ Beltrán Lopez, A.P. DNA Biosensors and Biomarkers to Cancer Detection. *International Biosensors & Bioelectronics* 4; 20–21. (2018)

⁵ Trapé Pujol J, Molina Porto R. Aspectos generales de los marcadores tumorales. *JaNO*. 1620: 45-8 (2006)

⁶ Winter, J.M., Yeo, C.J., Brody, J.R. Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology* 107, 15–22. (2013)

⁷ Mitchell, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10513–10518 (2008).

⁸ Tavallaie, R., De Almeida, S. R. M. & Gooding, J. J. Toward biosensors for the detection of circulating microRNA as a cancer biomarker: An overview of the challenges and successes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7, 580–592 (2015).

⁹ Sandhu S, Garzin R. Potential applications of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis and treatment. *Semin Oncol* 38, 781-787. (2011)

¹⁰ Zen, K. & Zhang, C. Y. Circulating MicroRNAs: A novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Medicinal Research Reviews* 32, 326–348 (2012)

- ¹¹ Rusling, J.F., Kumar, C.V., Patel, V. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst* 135, 2496–2511. (2010)
- ¹² Roointan, A., Ahmad Mirna, T. Akhtar, M.H. Early detection of lung cancer biomarkers through biosensor technology: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 164, 93–103. (2019)
- ¹³ Altintas, Z., Tothill, I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 188, 988–998. (2013)
- ¹⁴ Mikkelsen, S.R. Electrochemical Biosensors for DNA Sequence Detection. *Electroanalysis* 15–19. (1996)
- ¹⁵ Lusi, E.A., Passamano, M., Schiavo, L. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. *Analytical Chemistry* 81, 2819–2822. (2009)
- ¹⁶ Singh, P., Pandey, S.K., Singh, S.K. Biomedical Perspective of Electrochemical Nanobiosensor. *Nano-Micro Letters* 8, 193–203. (2016)
- ¹⁷ Banica, F.-G. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons 7; 118-134 (2012)
- ¹⁸ Yang H, Hui A, Pampalakis G, Soleymani L, Liu FF, Sargent EH, Kelley SO. Direct, electronic microRNA detection for the rapid determination of differential expression profiles. *Angew Chem Int Ed* 48:8461–8464. (2009)
- ¹⁹ Pöhlmann C, Sprinzl M. Electrochemical detection of microRNAs via gap hybridization assay. *Anal Chem* 82:4434–4440. (2010)
- ²⁰ Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J.M. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miARNs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 27–33. (2014)
- ²¹ Yang H, Hui A, Pampalakis G, Soleymani L, Liu FF, Sargent EH, Kelley SO. Direct, electronic microRNA detection for the rapid determination of differential expression profiles. *Angew Chem Int Ed* 48:8461–8464. (2009)
- ²² Laschi S, Palchetti I, Marrazza G, Mascini M. Enzyme-amplified electrochemical hybridization assay based on PNA, LNA and DNA probe-modified micro-magnetic beads. *Bioelectrochemistry*; 76(1-2):214-20. (2009)
- ²³ Trefulka, M, Bartošík M, Paleček E. Electrocatalysis in proteins, nucleic acids and carbohydrates. *Electrochem Commun* 12: 1760–1763. (2010)
- ²⁴ Peng Y, Gao Z. Amplified detection of microRNA based on ruthenium oxide nanoparticle-initiated deposition of an insulating film. *Anal Chem* 83:820–827. (2011)
- ²⁵ Yin H, Zhou Y, Chen C, Zhu L, Ai S. An electrochemical signal 'off-on' sensing platform for microRNA detection. *Analyst* 137:1389–1395. (2012)

- ²⁶ Dong H, Jin S, Ju H, Hao K, Xu L-P, Lu H, Zhang X. Trace and label-free microRNA detection using oligonucleotide encapsulated silver nanoclusters as probes. *Anal Chem* 84:8670–8674. (2012)
- ²⁷ Hong C-Y, Chen X, Liu T, Li J, Yang H-H, Chen J-H, Chen G-N. Ultrasensitive electrochemical detection of cancer-associated circulating microRNA in serum samples based on DNA concatamers. *Biosens Bioelectron* 50:132–136. (2013)
- ²⁸ Labib, M., Khan, N., Ghobadloo, S.M., Cheng, J., Pezacki, J.P., and Berezovski, M.V. Three-mode electrochemical sensing of ultralow MicroRNA levels. *Journal of the American Chemical Society* 135, 3027–3038. (2013)
- ²⁹ Yin, H., Zhou, Y., Zhang, H., Meng, X. & Ai, S. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. *Biosensors and Bioelectronics* 33, 247–253 (2012).
- ³⁰ Bartosik M., Hrstka. R., Palecek. E., Vojtesek B. Magnetic bead-based hybridization assay for electrochemical detection of microRNA. *Anal Chim Acta* 813, 35–40. (2014)
- ³¹ Campuzano S., Torrente-Rodríguez R.M., López-Hernández E., Conzuelo F., Granados R., Sánchez-Puelles J.M., Pingarrón J.M. Magnetobiosensors based on viral protein p19 for microRNA determination in cancer cells and tissues. *Angew Chem Int Ed.* 53, 6168–6171. (2014)
- ³² Salahandish, R. et al. Label-free ultrasensitive detection of breast cancer miRNA-21 biomarker employing electrochemical nano-genosensor based on sandwiched AgNPs in PANI and N-doped graphene. *Biosensors and Bioelectronics* 120, 129–136 (2018).
- ³³ Azimzadeh, M., Rahaie, M., Nasirizadeh, N., Ashtari, K. & Naderi-Manesh, H. An electrochemical nanobiosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer. *Biosensors and Bioelectronics* 77, 99–106 (2016).
- ³⁴ Miao, P., Wang, B., Yu, Z., Zhao, J. & Tang, Y. Ultrasensitive electrochemical detection of microRNA with star trigon structure and endonuclease mediated signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 63, 365–370 (2015).
- ³⁵ Kilic, T., Nur Topkaya, S. & Ozsoz, M. A new insight into electrochemical microRNA detection: A molecular caliper, p19 protein. *Biosensors and Bioelectronics* 48, 165–171 (2013).
- ³⁶ Danielson, D. C. & Pezacki, J. P. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS Letters* 587, 1198–1205 (2013).

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.