

Título: PLATAFORMAS ELECTROQUÍMICAS BIOSENSORAS SOBRE ORO PARA EL MANEJO CLÍNICO DEL CÁNCER

Nombre: Sánchez Salcedo, Raquel

Universidad: Universidad de Oviedo

Departamento: Química física y analítica

Fecha de lectura: 05/05/2023

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional por la Universidad de Oviedo

Dirección:

> **Director:** Rebeca Miranda Castro

> **Codirector:** MARIA JESUS LOBO CASTAÑÓN

Tribunal:

> **presidente:** MARÍA TERESA FERNÁNDEZ ABEDUL

> **secretario:** Miguel Aller Pellitero

> **vocal:** CARMEN LORENA MANZANARES PALENZUELA

> **vocal:** SUSANA CAMPUZANO RUIZ

> **vocal:** MANUEL DEL VALLE ZAFRA

Descriptores:

> QUIMICA ANALITICA

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

> <https://hdl.handle.net/10651/71723>

Localización: BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Resumen: En los últimos años la Química Analítica se ha centrado en la resolución de los principales problemas de la sociedad no solo en el campo del diagnóstico clínico sino también en el campo de la seguridad alimentaria o control ambiental. Dentro de estas áreas, los biosensores electroquímicos son de gran interés para el desarrollo de sistemas sensibles, rápidos, fiables, de bajo coste y enfocados en la realización de medidas in situ o Point-of-care (POC).

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de plataformas electroquímicas sobre superficies electrónicas de oro empleando distintos tipos de receptores de afinidad que proporcionan nuevas maneras de detectar proteínas y ácidos nucleicos relevantes en distintos campos, principalmente en el diagnóstico clínico. Todos los sensores desarrollados en este trabajo emplean transductores de oro debido a las características ventajosas que ofrece este soporte, como la variedad de estrategias disponibles para su rápida y eficiente funcionalización con biorreceptores o moléculas de captura.

De entre todos los biorreceptores de afinidad existentes, los anticuerpos (Ab) son los más utilizados hasta el momento para ensayos clínicos. Sin embargo, poseen algunas desventajas como puede ser la complejidad del proceso de obtención, que origina variedad entre lotes, o las condiciones restrictivas de almacenamiento. Como alternativa, se comenzaron a emplear oligonucleótidos sintéticos denominados aptámeros, obtenidos por un proceso de selección *in vitro* llamado SELEX. Estos presentan una capacidad de unión y reconocimiento de la molécula diana comparable, pero algunas mejoras como la obtención mediante su síntesis química y una mayor estabilidad térmica y química. Otra opción alternativa son los nanoanticuerpos (VHH), anticuerpos de dominio único que suponen una mejora respecto a los Ab convencionales debido a su menor tamaño y mayor afinidad, así como su sencilla obtención. La primera parte de esta Tesis Doctoral (Capítulo 4) se ha centrado en el desarrollo de sensores electroquímicos para la misma proteína, la interleuquina-6 (IL-6), usando los distintos tipos de receptores mencionados; dando lugar por un lado a un inmunosensor y por otro a un aptasensor. Se llevó a cabo la modificación de la superficie electródica anclando el Ab/VHH por enlace covalente y el aptámero por quimisorción; evaluando y comparando las características analíticas obtenidas para ambos sensores. Se seleccionó la IL-6 como molécula diana, por ser un biomarcador proteico de gran importancia clínica, involucrado en procesos inflamatorios agudos que pueden ser desencadenados por distintas patologías y enfermedades como el cáncer. A su vez, la técnica de detección empleada en el desarrollo del inmunosensor y aptasensor fue la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) no faradaica o capacitiva, una técnica muy sensible que permite la detección de la proteína sin necesidad de una marca redox; algo crucial para el diseño y desarrollo de un dispositivo implantable o wearable .

Otros receptores de afinidad muy populares son las sondas de ADN que, gracias a la hibridación altamente específica y estable entre dos hebras complementarias, permiten el reconocimiento y la unión de ácidos nucleicos diana específicos (ADN o ARN). Por tanto, suponen una herramienta muy poderosa para el desarrollo de genosensores electroquímicos, como los diseñados y desarrollados en este trabajo (Capítulo 5), para biomarcadores específicos del cáncer de próstata y de colon. A la hora de desarrollar un método de diagnóstico, tan importante como la selección del receptor es decidir qué se va a detectar, es decir, la selección de una diana altamente específica y selectiva para la patología a diagnosticar. En esta Tesis Doctoral se seleccionaron los genes PCA-3 y CCAT1 como dianas para el diagnóstico del cáncer de próstata y colorrectal, respectivamente; ambos genes pertenecen a la categoría de los llamados ARNs largos no codificantes o lncARNs, que en un principio se consideraron ruido genómico ya que se desconocía su función específica. Hoy en día, gracias a los avances tecnológicos, se conoce que el genoma no codificante está involucrado en numerosos procesos biológicos, como la transcripción y replicación del ADN o el crecimiento celular. De hecho, se ha confirmado que solo un 3% del genoma humano codifica la síntesis de proteínas y que el resto es material no codificante. La mayoría de los elementos reguladores no codificantes se transcriben en lncARNs, que se encuentran desregulados durante la tumorigénesis o la progresión del cáncer. Además, la mayoría de ellos son liberados por las células tumorales a los fluidos biológicos, lo que permite la detección no invasiva del cáncer mediante biopsia líquida en muestras como sangre, orina, líquido cerebroespinal o saliva.

Uno de los mayores problemas en la detección y determinación de este tipo de biomarcadores es su baja abundancia natural. Con el objetivo de desarrollar métodos suficientemente sensibles para su uso en la práctica clínica, en este trabajo se han desarrollado genosensores electroquímicos con amplificaciones enzimáticas de la señal. Estos genosensores también se acoplaron a técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. En este sentido, se han explorado diferentes técnicas de amplificación como la técnica más común y conocida para amplificar ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, el empleo de esta técnica requiere una instrumentación compleja y supone un coste económico elevado. En consecuencia, se exploraron

alternativas rápidas, de bajo coste y alta eficiencia en consonancia con el concepto Point-of-care. La técnica de amplificación estudiada y aplicada (Capítulo 6) fue la amplificación isotérmica por recombinasa polimerasa o RPA. Así se ha diseñado y desarrollado con éxito un genosensor que integra la amplificación del material genómico completo de un patógeno y su detección electroquímica, lo que confirma la utilidad del dispositivo diseñado para el análisis del genoma de diversas dianas en aplicaciones futuras.