

### BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA NUEVOS BIOMARCADORES TUMORALES: APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Raquel Sánchez Salcedo, Ana Díaz Fernández, Rebeca Miranda Castro, Noemí de los Santos Álvarez, María Jesús Lobo Castañón

Grupo de Electroanálisis (GEUO). Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo.  
Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)

#### Introducción

Debido a la COVID-19, ahora nos encontramos en un momento particularmente difícil para los servicios de salud y la investigación. Reaccionar a la pandemia es importante, pero también lo son muchas otras prioridades de salud que no han desaparecido. Una de ellas es el cáncer; no debemos permitir que la COVID-19 detenga el progreso que se estaba logrando en la comprensión, detección y tratamiento de este conjunto de enfermedades. En este contexto, es claro que el diagnóstico temprano del cáncer puede transformar la vida de las personas que lo padecen. El establecimiento de programas de detección precoz y de cribado para diferentes tipos de cáncer, que pudieran alcanzar a toda la población, aumentaría de manera considerable la detección de cánceres en una fase más temprana. Esto permitiría iniciar tratamientos adecuados y menos invasivos, aumentando las posibilidades de supervivencia y mejorando la calidad de vida de las personas que viven con y después del cáncer.

En la actualidad, el diagnóstico de la mayoría de cánceres requiere extraer una muestra del tejido tumoral (biopsia tisular) y analizarlo. Para la extracción es necesario realizar una punción o una cirugía, lo que resulta costoso, además de las posibles complicaciones y molestias que supone para el paciente. El análisis de biomarcadores circulantes que se desprenden de las células tumorales y de su entorno, llegando a diferentes fluidos biológicos, es una alternativa muy prometedora para detectar tumores presintomáticos. Este nuevo concepto de diagnóstico recibe el nombre de biopsia líquida. Esta podría aportar de manera sencilla información sobre el inicio del desarrollo de los tumores y además permitiría llevar un seguimiento del progreso de la patología. La sangre es el fluido biológico que se evalúa habitualmente, aunque en algunos tipos particulares de tumores también se puede utilizar orina, saliva o líquido cefalorraquídeo.

Una de las claves para desarrollar pruebas de biopsia líquida, no solo lo suficientemente sensibles sino también específicas de un tumor, es identificar los biomarcadores adecuados. Las tecnologías ómicas están contribuyendo de manera espectacular a la identificación de estas moléculas, aunque cada vez más estudios señalan que para identificar de manera temprana la presencia de cánceres, así como localizar el origen de los mismos, es necesario desarrollar ensayos de detección multi-análito, en los que se combinen biomarcadores genéticos y proteicos [1].

El grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo, perteneciente al Área de Biotecnología y análisis biomédico del Instituto de

Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, centra en la actualidad sus líneas de investigación en el desarrollo de herramientas de detección sensible y selectiva de nuevas moléculas, identificadas como potenciales biomarcadores de diferentes tipos de cáncer. Entre las dianas identificadas como prometedoras en la detección precoz del cáncer se encuentran marcadores genéticos (ARNs largos no codificantes) y glicoproteínas, fijándonos en este último caso en alteraciones en el patrón de glicosilación de las mismas asociadas al desarrollo de los tumores. En este artículo, se resumen los esfuerzos recientes de nuestro grupo para desarrollar sensores electroquímicos para estos tipos de dianas, demostrando su utilidad en la detección del cáncer de próstata.

#### Diagnóstico del cáncer de próstata: estado actual

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de tumor más frecuente en varones y constituye en este grupo de población la quinta causa de mortalidad por cáncer [2]. Es un tumor de crecimiento lento, de manera que más de un 50% de hombres por encima de 50 años puede estar desarrollando cáncer de próstata sin síntomas clínicos [3]. Además, cuando aparecen, las manifestaciones clínicas del CaP son similares a las de la hiperplasia benigna de próstata (HBP), sin que sea posible diferenciar ambas patologías por la clínica. El diagnóstico temprano, en una etapa inicial de desarrollo, cuando el cáncer está localizado, es la mejor forma de disminuir la mortalidad por CaP [3].

Tradicionalmente el diagnóstico de CaP se realiza mediante revisión prostática, que implica la realización de un tacto rectal y la determinación en sangre del antígeno prostático específico (PSA). Sin embargo, estas pruebas no son específicas, por lo que es frecuente confirmar el diagnóstico mediante biopsia prostática ecodirigida, una prueba muy invasiva y no exenta de efectos secundarios adversos. El uso del PSA como biomarcador del CaP se asocia con una alta tasa de falsos positivos de hasta 75% y una tasa significativa de falsos negativos (~15 a 17%) [4]. Por lo tanto, la implantación del test de PSA ha contribuido a aumentar el número de biopsias y re-biopsias innecesarias, así como al sobrediagnóstico o sobretratamiento del CaP, lo que afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes, además de los considerables costes sanitarios que conlleva [5].

Se han realizado múltiples investigaciones dirigidas a desarrollar pruebas o estudios no invasivos para mejorar la especificidad diagnóstica del CaP y diferenciar los casos más agresivos de los cánceres indolentes, evitando así biopsias innecesarias [6]. Entre estas destacan la resonancia magnética nuclear multiparamétrica (RMN-mp) y la detección de nuevos biomarcadores, tanto en suero como en orina [6]. La RMN-mp se encuentra entre las metodologías más adecuadas para seleccionar pacientes candidatos a biopsia de próstata, evitando esta prueba en aproximadamente un 27% de los pacientes [7]. Sin embargo, requiere un moderno y costoso equipo y un radiólogo experto en esta técnica. En cuanto a los nuevos biomarcadores, se han identificado muchas posibilidades, aunque pocas se han llegado a implantar en la práctica clínica [8].

**Aptámeros para el reconocimiento de patrones de glicosilación del PSA asociados al CaP**

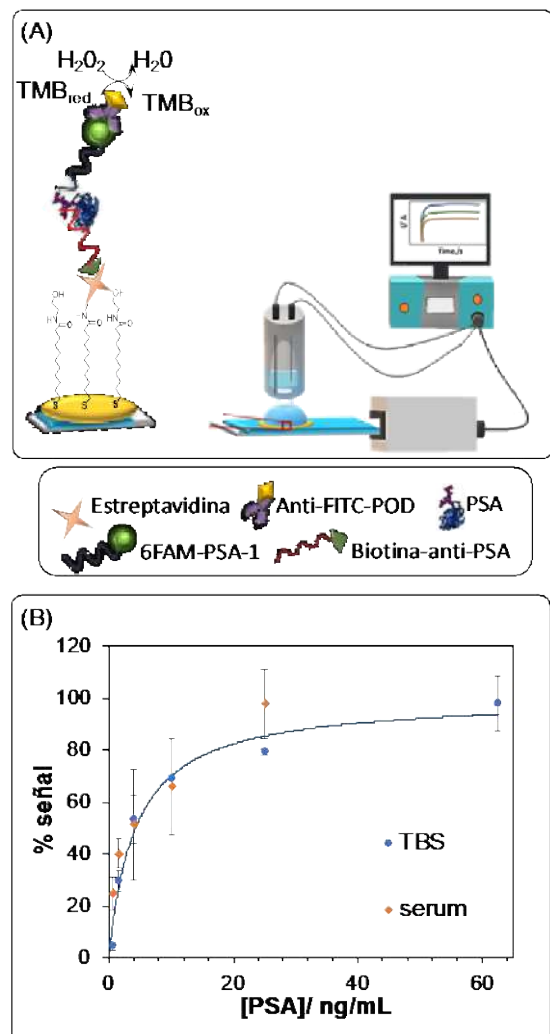
La glicosilación es una modificación postraduccional de las proteínas que juega un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer [9]. Existen numerosos estudios que relacionan cambios en la composición de glicanos del PSA con la transformación maligna y la progresión del CaP [10]. A pesar de esto, el estudio de glicofomas específicas de PSA asociadas al CaP no se ha aplicado al diagnóstico clínico debido a la falta de pruebas analíticas para medir el porcentaje de PSA con estas formas de glicosilación aberrantes. Esta información se obtiene típicamente combinando un ensayo ELISA para medir el PSA total o libre y ensayos con lectinas para detectar formas glicosiladas específicas de PSA. Una de las principales limitaciones de este tipo de ensayos es la escasa afinidad y selectividad de las lectinas. Por tanto, el diagnóstico y seguimiento del CaP podrían beneficiarse del desarrollo de nuevos receptores capaces de detectar glicosilaciones aberrantes del PSA, entre los que cabe destacar los aptámeros [11, 12].

Nuestro grupo ha desarrollado dos procesos de selección de aptámeros frente a PSA, con un diseño adecuado para dirigir el reconocimiento hacia la fracción glicosídica de la proteína [13,14]. En el primero de ellos, se combinaron etapas de selección positiva frente al PSA humano, con contraselecciones empleando una forma recombinante, no glicosilada de la proteína [13]. Con esta estrategia, se identificó y caracterizó un aptámero, PSA-1, capaz de reconocer la porción externa de la estructura glicosídica del PSA, con una buena afinidad ( $K_d = 177$  nM). Posteriormente, se diseñó una variante del proceso SELEX para dirigir la selección de aptámeros hacia el sitio de glicosilación de glicoproteínas, de manera que el reconocimiento sea binario e implique tanto a la proteína como al azúcar de la diana. Con este objetivo, se incorporaron etapas de elución selectiva con lectinas al diseño anterior. Así, se obtuvieron por primera vez aptámeros que involucran en el reconocimiento de la proteína la fracción del azúcar más próxima a esta y los péptidos que la rodean. Uno de los aptámeros identificados, PSAG-1, presenta afinidad nM hacia el PSA, superior a la de lectinas naturales. Además, discrimina PSA de glicoproteínas con un patrón de glicosilación similar. La fucosa más próxima a la proteína

está implicada en el reconocimiento, lo que convierte este aptámero en una excelente herramienta para detectar cambios en el nivel de fucosilación de PSA asociados al cáncer de próstata [14].

**Aptasensores electroquímicos para PSA**

Se seleccionó el primero de los aptámeros descritos, PSA-1 conjugado con una molécula de fluoresceína, como receptor indicador para la construcción de un sensor cronamperométrico con formato sándwich. Con el objetivo de detectar los cambios en la glicosilación del PSA que se producen durante la transformación tumoral del tejido prostático, se utilizó como receptor de captura de este sensor un aptámero ya descrito en la literatura (anti-PSA) [15], capaz de reconocer el PSA total. Se inmovilizó este aptámero marcado con biotina a la superficie de electrodos de oro modificados con estreptavidina (Figura 1A).



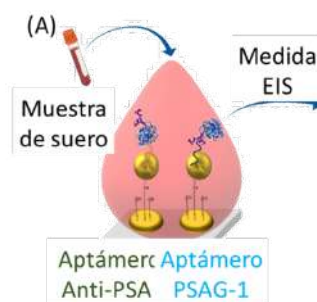
**Figura 1:** A) Esquema del aptasensor con formato sándwich y transducción cronamperométrica. B) Curva de respuesta del aptasensor a PSA en disolución reguladora de Tris-HCl (TBS) y suero diluido 1:1 en TBS. Adaptada de la referencia [13].

El funcionamiento de este sensor implica su incubación en patrones o muestras que contienen PSA, seguido de la interacción con el aptámero PSA-1-fluoresceína. El complejo sándwich formado en la superficie sensora se marca a continuación con un conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa, lo que permite verificar la etapa de transducción amperométrica tras la adición de tetrametilbenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos de la peroxidasa.

En la Figura 1B se muestran la curva de respuesta del sensor tanto en patrones de PSA preparados en disolución reguladora como en muestras de suero con una dilución 1:1. No hay diferencias significativas entre la señal obtenida en disolución reguladora y la obtenida en las muestras de suero. El sensor presenta un límite de detección (LD) de 0,66 ng/mL de PSA, lo que permite su aplicación a la determinación de esta glicoproteína en muestras con interés desde el punto de vista clínico.

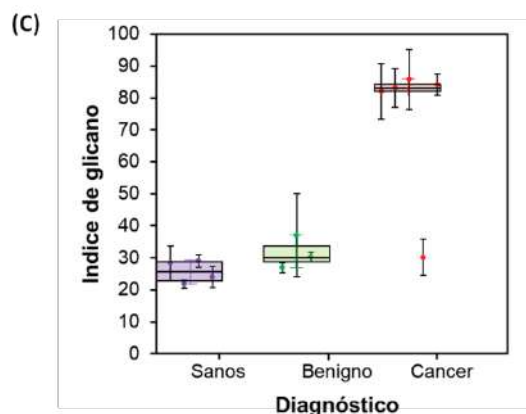
En su validación, se utilizó el sensor descrito para medir la concentración de PSA en 34 muestras de suero de pacientes con distintas patologías y diferentes niveles de PSA total, analizadas en el Hospital Universitario de Cabueñes mediante el ensayo ELISA automático ADVIA Centaur® (Siemens). Los resultados obtenidos con el sensor concuerdan con los del ELISA en un 60% de las muestras analizadas. Las discrepancias observadas son probablemente consecuencia de las diferencias en los patrones de glicosilación en el PSA de las muestras analizadas. Un análisis más detallado de los valores discordantes indica que el sensor proporciona menores valores de PSA que el ELISA en el suero de pacientes con HBP. Estos resultados apuntan a que el nuevo ensayo basado en aptámeros puede mejorar la especificidad en el diagnóstico de cáncer con respecto al método ELISA utilizado en la actualidad en los hospitales, proporcionando un menor número de falsos positivos y, por tanto, con potencial para disminuir las biopsias innecesarias.

Con el objetivo de obtener información sobre la fracción de PSA total que presenta un patrón de glicosilación específico en una determinada muestra, se propuso el diseño de una plataforma dual basada en aptámeros para la medida del PSA total y el PSA reconocido por el segundo de los aptámeros desarrollados por el grupo, PSAG-1 con un reconocimiento binario de la proteína. Para simplificar el proceso de medida, se desarrollaron aptasensores con un formato de ensayo directo, en los que se inmovilizó el aptámero sobre el transductor, de manera que el evento de reconocimiento aptámero-proteína produce un cambio en la resistencia a la transferencia electrónica de la capa selectiva. Como método de transducción se utilizó la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). (Figura 2A). Con este formato, se combinaron dos aptámeros diferentes frente a PSA (anti-PSA y PSAG-1), inmovilizados sobre nanopartículas de oro para obtener la plataforma dual impedimétrica [16]. Este sistema dual permite la medida directa y rápida de diferentes fracciones de PSA en suero tras una simple dilución de la muestra.



(B)

$$\text{Índice de Glicano} = \frac{[\text{PSA reactiva a PSAG} - 1]}{[\text{PSA total}]} \cdot 100$$



**Figura 2:** A) Esquema de la plataforma dual impedimétrica para la medida del índice de glicano de PSA en muestras, tal y como se define en B). C) Correlación entre el índice de glicano obtenido en muestras de suero de diferentes pacientes y la patología diagnosticada. Adaptado de la referencia [16].

Los dos sensores que integran la plataforma presentan un intervalo dinámico de respuesta que abarca el intervalo de concentraciones útil desde el punto de vista clínico, con un LD de 0,26 ng/mL para el sensor basado en PSAG-1 y 0,64 ng/mL para el basado en anti-PSA.

La información final que aporta esta plataforma es un índice empírico, denominado índice de glicano para PSA en suero y definido como la fracción de PSA total que es reactiva frente al aptámero PSAG-1 (Figura 2B). Cuando se validó en muestras de pacientes, se observó que este índice tiene un mayor poder predictivo para diferenciar pacientes con cáncer de próstata de individuos sanos o con patologías benignas de la próstata que la medida del PSA total (Figura 2C). Aunque será necesario evaluar un número más amplio de muestras, nuestros resultados apoyan el uso del índice de glicano para reducir las biopsias innecesarias sin comprometer la capacidad de diagnosticar el CaP.

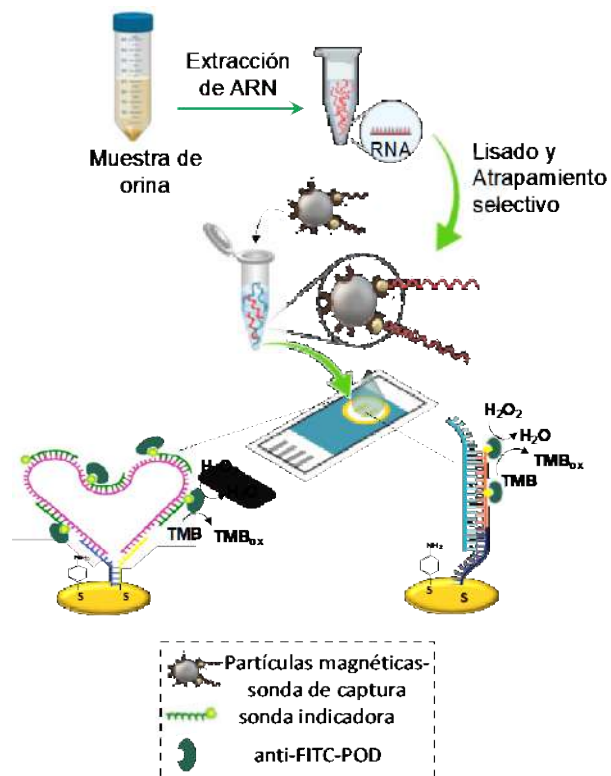
**Detección de ARNs largos no codificantes**

Entre los biomarcadores genéticos, el ARN conocido como PCA3 se presenta como un biomarcador alternativo para el diagnóstico del cáncer de próstata, con capacidad para distinguir entre enfermedad agresiva y no agresiva. Identificado por primera vez en 1999, PCA3 es parte del gran porcentaje de transcriptoma humano que no participa en la síntesis de proteínas, en la categoría de ARN largo no codificante, lncRNA [17].

Para complementar el uso de glicoproteínas como marcadores de cáncer, se desarrollaron genosensores para la detección de este lncRNA cuya sobreexpresión se relaciona con el CaP [18,19]. Con este fin se ha diseñado y caracterizado un genosensor sobre electrodos de oro con formato sándwich y múltiples secuencias indicadoras (Figura 3). La fase de reconocimiento selectivo de PCA3 consiste en una monocapa binaria autoensamblada construida por quimisorción de una estructura de captura en forma de Y preformada en disolución y *p*-aminotiofenol. La reacción de hibridación de esta estructura con el dúplex formado entre el PCA3 y las cinco sondas de detección marcadas con una molécula de fluoresceína, permite obtener mediante medidas de cronoamperometría información sobre la cantidad de PCA3 en disolución tras la adición del conjugado anti-fluoresceína-peroxidasa, con señal amplificada [18]. Este sensor presenta un intervalo dinámico lineal de respuesta entre 25 pM y 10 nM, con un LD de 4,4 pM.

Teniendo en cuenta que la cantidad de PCA3 en la muestra estará afectada por el número de células del tejido prostático que llegan a la orina, la cuantificación de PCA3 debe hacerse con referencia a un ARN de control interno. Con este propósito se seleccionó el mRNA denominado PSA, ya que sus niveles no se ven afectados en caso de CaP. Se diseñó un segundo genosensor para este transcrito con un formato similar al descrito para PCA3 [18]. En este caso, teniendo en cuenta la menor longitud de la secuencia diana seleccionada, así como los niveles de expresión esperados para este fragmento de referencia, se utilizaron dos secuencias indicadoras en lugar de cinco como en el diseño anterior. Las características analíticas obtenidas para este diseño son comparables a las ya descritas para el genosensor de PCA3. Se obtiene un intervalo lineal de respuesta entre 0,025 y 1 nM, con un LD de 1,5 pM y una desviación estándar relativa promedio del 16% [18].

Finalmente, se integraron ambos sensores en una plataforma dual electroquímica, que permite la medida simultánea de PCA3 y PSA. Los genosensores desarrollados son válidos para cuantificar el lncRNA en células tumorales y en muestras de orina. Con este fin, es necesario extraer el RNA de las muestras y llevar a cabo un atrapamiento selectivo de las secuencias dianas sobre partículas magnéticas modificadas con sondas de captura complementarias a los fragmentos de PCA3 y PSA que se detectan con el genosensor. Se propone utilizar la relación de señales medidas con los dos genosensores para estimar los niveles de expresión de PCA3, que podría ser útil en el diagnóstico y estratificación de pacientes con CaP [18].



**Figura 3:** Esquema de las etapas necesarias para el análisis de PCA3 en muestras de orina. Tras aislar el sedimento en la orina, se produce el lisado celular y el atrapamiento selectivo de PCA3 y el fragmento de RNA utilizado como control interno (PSA) sobre partículas magnéticas modificadas con sondas de ADN específicas. La medida se realiza sobre una plataforma sensora dual que permite la detección amperométrica simultánea de PSA y PCA3. Adaptado de la referencia [18].

Además, se ha adaptado el genosensor de PCA3 a un genoensayo sobre partículas magnéticas, empleando fosfatasa alcalina (ALP) como molécula indicadora. De esta forma, en la etapa final de medida se utiliza D-glucosa-1-fosfato como sustrato de ALP. La hidrólisis de este sustrato produce glucosa, que se mide con un glucómetro convencional. El genoensayo con este formato presenta una buena sensibilidad para PCA3, con un rango dinámico de 5 a 100 pM y un límite de cuantificación de 5 pM. El uso de un glucómetro estándar en la etapa final de medida facilita la traslación a la práctica clínica de este tipo de ensayos [19].

**Conclusiones**

Los estudios presentados en este artículo muestran el potencial que los sensores electroquímicos que utilizan ácidos nucleicos como elemento de reconocimiento tienen para realizar pruebas de biopsia líquida multianálito. Los dispositivos



desarrollados para la detección de lncRNA o cambios de glicosilación asociados al CaP podrían adaptarse a otras dianas de interés para el diagnóstico de cánceres de muchos tipos. Para establecer realmente la utilidad clínica de estos dispositivos, se requerirán estudios de validación de los mismos en un número mucho más amplio de muestras clínicas. De esta forma, podrían contribuir a establecer nuevos programas de detección precoz y de cribado para diferentes tipos de cáncer, aumentando considerablemente la detección de cánceres en una fase más temprana, con la consiguiente mejora en las posibilidades de supervivencia y calidad de vida de las personas diagnosticadas.

### Agradecimientos

El trabajo del grupo está en la actualidad financiado por el Ministerio de Ciencia y Universidades a través del proyecto RTI-2018-095756-B-I00.

### Referencias

- [1] J.D. Cohen et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018, 359, 926–930.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A., Jemal, F. Bray. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209–249.
- [3] P. Rawla. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* 2019, 10, 63–89.
- [4] P.D. Sershon, M.J. Barry, J.E. Oesterling. Serum prostate-specific antigen discriminates weakly between men with benign prostatic hyperplasia and patients with organ-confined prostate cancer. *Eur. Urol.* 1994, 25, 281–287
- [5] W.J. Catalona. Prostate cancer screening. *Med. Clin. North. Am.* 2018, 102, 199–214.
- [6] D.J. Lomas, H.U. Ahmed. All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020, 17, 372–318.
- [7] H.U. Ahmed, A.E.-S. Bosaily, L.C. Brown, R. Gabe, R. Kaplan, M.K. Parmar et al. Diagnostic accuracy of multiparametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet* 2017, 389, 815–822.
- [8] S.S. Pinho, C.A. Reis. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 540–555.
- [9] S. Saini. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology* 2016, 39, 97–106
- [10] J. Tkac, V. Gajdosova, S. Hroncekova, T. Bertok, M. Hires, E. Jane, L. Lorencova, P. Kasak. Prostate-Specific Antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. *Interface Focus* 2019, 9, 20180077.
- [11] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. Post-translational modifications in tumor biomarkers: the next challenge for aptamers? *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410, 2059–2065.
- [12] A. Díaz-Fernández, R. Lorenzo-Gómez, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. Electrochemical aptasensors for cancer diagnosis in biological fluids – A review. *Anal. Chim. Acta* 2020, 1124, 1–19.
- [13] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro N. de-los-Santos-Álvarez, E. Fernández-Rodríguez, M.J. Lobo-Castañón. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 120, 83–90.
- [14] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. Diaz, D. Suarez, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. Aptamers targeting protein-specific glycosylation in tumor biomarkers: general selection, characterization and structural modeling. *Chem. Sci.* 2020, 11, 9402–9413.
- [15] N. Savory, K. Abe, K. Sode, K. Ikebukuro. Selection of DNA aptamer against Prostate Specific Antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 1386–1391.
- [16] A. Díaz-Fernández, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, P. Estrela. Impedimetric aptamer-based glycan PSA score for discrimination of prostate cancer from other prostate diseases. *Biosens. Bioelectron.* 2021, 175, 112872.
- [17] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. Long noncoding RNAs: from genomic junk to rising stars in the early detection of cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, 411, 4265–4275.
- [18] R. Sánchez-Salcedo, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. Dual electrochemical genosensor for early diagnosis of prostate cancer through lncRNAs detection. *Biosens. Bioelectron.* 2021, 192, 113520.
- [19] C. Abardía-Serrano, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón. New uses for the personal glucose meter: detection of nucleic acid biomarkers for prostate cancer screening. *Sensors* 2020, 20, 5514.