

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETECTAR CAMBIOS EN LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE ARNs LARGOS NO CODIFICANTES ASOCIADOS A CÁNCER

Rebeca Miranda Castro, Raquel Sánchez Salcedo, 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)

1. Introducción

Como resultado del envejecimiento demográfico y la globalización de estilos de vida poco saludables, la incidencia del cáncer a nivel mundial aumenta de forma constante, y ni siquiera una pandemia ha conseguido reducir su prevalencia [1]. La mayoría de los cánceres se detectan cuando los síntomas se hacen evidentes; sin embargo, los beneficios de la terapia médica son más limitados en los cánceres en estado avanzado. Por el contrario, una detección temprana del cáncer suele ofrecer una alta probabilidad de ser tratado y curado.

Para optimizar los programas de detección y desarrollar enfoques novedosos para el diagnóstico temprano, resulta necesario disponer de nuevos biomarcadores para la detección fiable y eficiente de los primeros signos del cáncer, especialmente en los tipos de tumores que suelen diagnosticarse en etapas tardías como el cáncer de páncreas o de pulmón, así como en aquellos tumores cuyos biomarcadores actuales se ven alterados no solo cuando se produce una proliferación maligna de células sino también cuando se desarrollan lesiones benignas como el cáncer de próstata y el colorrectal. Además, debido a la diversidad molecular del cáncer, un único biomarcador suele mostrar un potencial diagnóstico limitado. Por ello, resulta más efectivo el empleo de un panel de biomarcadores circulantes, lo que exige el desarrollo de ensayos multianalito.

En este contexto, el transcriptoma circulante ha despertado grandes expectativas entre los investigadores. El desciframiento del genoma humano trajo consigo importantes hitos, algunos de los cuales fueron tan llamativos como que la mayor parte del ADN genómico se transcribe a ARN (al menos el 90%), aunque los genes que codifican proteínas representan menos del 2% del genoma humano completo. Estos resultados chocan con la tendencia a considerar las proteínas como los principales actores en las funciones celulares y el ARN como un simple intermediario en la maquinaria de síntesis proteica. La pregunta que surgió a partir de estos hallazgos fue la siguiente: ¿tiene el transcriptoma humano no codificante un significado biológico o, por el contrario, es un mero "turista" en el camino evolutivo? Aunque inicialmente se descartó como simple ruido transcripcional, considerando el gasto energético que supone para las células, cabría esperar que al menos parte de este ARN no codificante desempeñase alguna función en el organismo. La exploración profunda del transcriptoma humano ha señalado la necesidad de reconsiderar la idea inicial.

2. ARNs largos no codificantes: nuevos actores en la investigación del cáncer

Recientemente, con los avances en la tecnología de secuenciación de ARN, una nueva categoría de transcritos no codificantes se ha convertido en el centro de atención, los llamados ARNs largos no codificantes, abreviados como lncRNAs, por sus siglas en inglés. Los lncRNAs constituyen un subconjunto extenso y heterogéneo de transcritos celulares, incapaces de codificar proteínas, con una longitud superior a 200 nucleótidos. Están implicados en un amplio repertorio de procesos biológicos [2] y sus alteraciones se han asociado a numerosas enfermedades humanas entre las que se incluye el cáncer. En el contexto del cáncer, los lncRNAs pueden funcionar como oncogenes o supresores de tumores. En consecuencia, los lncRNAs podrían utilizarse como herramientas de diagnóstico e incluso como dianas terapéuticas [3]. En el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo estamos interesados en aprovechar su potencial diagnóstico.

Muchos estudios han demostrado la relevancia clínica del perfil de expresión alterado de ciertos lncRNAs en el cáncer. En consecuencia, sus niveles de expresión podrían emplearse para el diagnóstico de esta enfermedad, e incluso el pronóstico y la recidiva [4]. Gran parte de estas investigaciones se ha llevado a cabo con muestras de tejidos tumorales; pero también se ha explorado la relación entre los lncRNAs circulantes y el cáncer, encontrando cambios sustanciales en la abundancia de ciertos lncRNAs entre pacientes con cáncer e individuos sanos.

La importancia de los lncRNAs en el cáncer se ha investigado fundamentalmente mediante la secuenciación del ARN [5]; sin embargo, este método es muy laborioso y sigue siendo caro de implementar como prueba molecular de rutina. Alternativamente, se han descrito algunos métodos analíticos para la determinación de lncRNAs asociados al cáncer [6] y estos implican procedimientos de varias etapas que requieren tiempos largos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de disponer de dispositivos que sean muy sensibles y selectivos, para minimizar falsos negativos y falsos positivos, además de rápidos, con un precio asequible, fáciles de utilizar y con capacidad de multiplexado para la detección de lncRNAs asociados a cáncer.

Los dispositivos de bioanálisis electroquímico, también conocidos como genosensores y genoensayos electroquímicos, tienen el potencial para abordar este desafío y se han logrado grandes avances en este campo.

Estos utilizan la reacción de hibridación, es decir, el emparejamiento de hebras complementarias de ácidos nucleicos de acuerdo con las reglas de Watson-Crick, como reacción de reconocimiento biomolecular, la cual exhibe una enorme selectividad. Además, la transducción electroquímica ha demostrado ser particularmente adecuada para el desarrollo de dispositivos analíticos portátiles de bajo coste y consumo energético [7]. Las ventajas de la miniaturización (volúmenes de muestra reducidos, tiempos de reacción más rápidos y la posibilidad de detección multiplexada, es decir, la capacidad de interrogar varias dianas a la vez) son de particular interés en el diagnóstico clínico y, específicamente, en el manejo del cáncer.

3. Detección de lncRNAs asociados a CCR

En nuestro grupo de investigación nos hemos centrado en el cáncer colorrectal (CCR) que se origina en el epitelio intestinal, representa la segunda causa de mortalidad asociada a cáncer en el mundo y ocupa el tercer lugar en términos de incidencia [1]. Se han descrito varios lncRNAs como potenciales marcadores de este tipo de cáncer entre los que destaca el transcrito 1 asociado a cáncer de colon o CCAT1, cuya expresión se encuentra alterada tanto en tejidos como en fluidos biológicos de pacientes con CCR [8]. Por ello, nos hemos propuesto desarrollar genosensores electroquímicos para el lncRNA CCAT1 como prueba de biopsia líquida para la detección precoz de este tipo de cáncer [9].

Los sensores de hibridación tipo sándwich han demostrado ser de gran utilidad para detectar secuencias de ADN y ARN. Sin embargo, para aplicar esta tecnología al desarrollo de pruebas mínimamente invasivas basadas en la detección del lncRNA CCAT1, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, el ensayo debe permitir la determinación precisa del lncRNA a niveles muy bajos en una muestra compleja como suero o plasma. La longitud de la secuencia diana y su fuerte estructura secundaria interna son factores cruciales que deben considerarse para minimizar la pérdida de sensibilidad. Además, el ARN debe extraerse de la muestra, y se necesita una cuantificación relativa para reducir errores debidos a variaciones en la calidad y cantidad del ARN extraído. Esto implica determinar los cambios en la expresión del lncRNA CCAT1 relativos a los niveles de un control interno de ARN, que se expresa de manera estable en las muestras evaluadas.

Para superar estos retos, hemos desarrollado dos sensores para la detección de fragmentos específicos de CCAT1, potencial biomarcador de CCR, y GAPDH, un gen endógeno comúnmente empleado como referencia. El diseño se basa en una estrategia general para maximizar la sensibilidad de los genosensores tipo sándwich [10]. Seleccionando una secuencia diana de longitud suficiente, es posible diseñar varias sondas de detección (DP), que se hibridan simultáneamente con las regiones complementarias de la diana. De esta forma, una vez atrapado el dúplex sobre la fase sensora, una única

molécula diana se unirá a múltiples enzimas redox utilizadas como moléculas indicadoras, con la consiguiente amplificación de la señal.

3.1. Diseño de genosensores para CCAT1 y GAPDH

Una etapa crítica en el diseño de un genosensor es la selección *in silico* de la secuencia diana y de las correspondientes sondas complementarias que determinarán la sensibilidad y la selectividad de la plataforma de detección. La longitud de la diana también es clave. Habitualmente oscila entre 65 nt y 200 nt, lo suficientemente larga como para permitir el diseño de múltiples DPs y lo suficientemente corta para hacer posible la formación de un dúplex ADN/ARN en superficie tras la hibridación con la sonda de captura y las sondas de detección. A partir de la base de datos GenBank se obtiene la secuencia de bases completa de los transcritos CCAT1 y GAPDH. Empleando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST se identifican fragmentos específicos del tamaño deseado para cada transcrito. Con la ayuda del programa Mfold se analizan las distintas opciones y se escoge aquella con menor estructura secundaria.

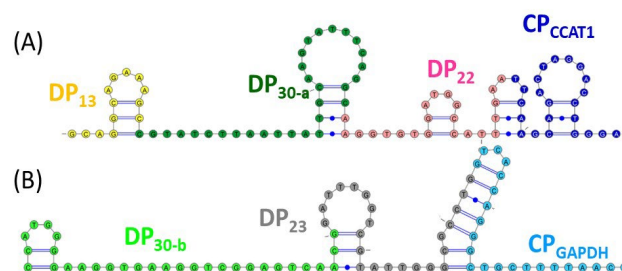


Figura 1. Estructura secundaria más estable para la secuencia específica del transcrito (A) CCAT1 (88 nucleótidos) y (B) GAPDH (75 nucleótidos) a 25°C y 0,3 M de Na⁺ obtenida con el programa Mfold. Las regiones coloreadas son complementarias a la sonda de captura (CP) o a las sondas de detección (DP) indicadas.

Cumpliendo con los criterios anteriores, se seleccionó un fragmento de 88 nt como diana para detectar el lncRNA CCAT1, y un fragmento de 75 nt para la detección del transcrito GAPDH. La estructura secundaria de ambos fragmentos se muestra en la Figura 1. A continuación se diseñó una sonda de captura complementaria al extremo 3' de la secuencia diana y varias sondas de detección (3 para CCAT1 y 2 para GAPDH) complementarias al resto de la secuencia para romper el plegamiento interno del analito, asegurando la formación de un dúplex perfecto tras la hibridación con la consiguiente mejora de la sensibilidad.

3.2. Desarrollo y optimización de los genosensores

La fase sensora selectiva al CCAT1 se construye sobre electrodos serigrafiados de oro mediante quimisorción de la sonda de captura tiolada, y el oro que queda sin recubrir se bloquea con *p*-aminotiofenol (Figura 2). Esta fase sensora hibrida con el dúplex generado en

disolución entre la secuencia diana y las 3 sondas de detección modificadas con fluoresceína mediante choque térmico. El complejo resultante se incuba con la enzima peroxidasa conjugada al fragmento Fab del anticuerpo antifluoresceína. Mediante la interacción de afinidad fluoresceína-antifluoresceína se fijan múltiples moléculas de enzima por cada híbrido formado sobre la superficie sensora. Finalmente, se añaden los sustratos de la enzima (peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para medir la actividad enzimática inmovilizada mediante cronoamperometría. La intensidad de corriente eléctrica registrada es directamente proporcional a la concentración de CCAT1 presente en la muestra.

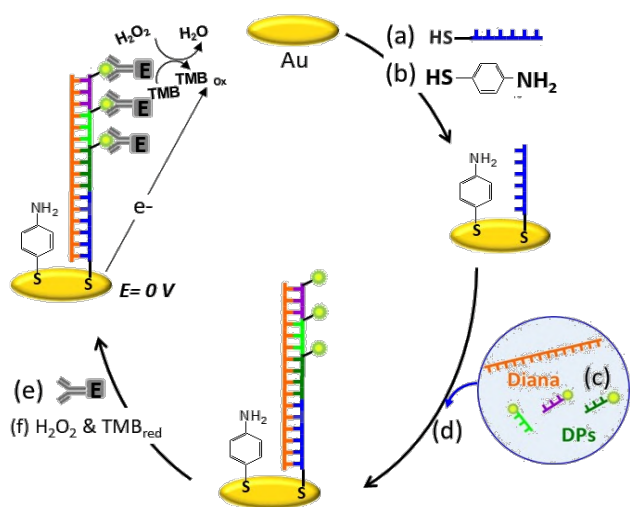


Figura 2. Diseño de los genosensores electroquímicos: (a) quimisorción de la sonda de captura tiolada, (b) bloqueo con *p*-aminotiofenol, (c) hibridación homogénea entre la secuencia diana y las sondas de detección funcionalizadas con fluoresceína, (d) hibridación heterogénea, (e) marcaje enzimático, (f) reacción enzimática y detección cronoamperométrica.

Para evitar conclusiones equivocadas derivadas de la inestabilidad del ARN, el desarrollo y optimización del genosensor electroquímico se llevó a cabo empleando un fragmento de ADN cuya secuencia de bases coincide con la del ARN de interés. Este genosensor presenta un intervalo de respuesta lineal comprendido entre 5 y 500 pM de CCAT1 ($I_{net} (\mu A) = (9,7 \pm 0,4) [CCAT1] (nM) + (0,10 \pm 0,07)$; $r = 0,996$), con un límite de detección estimado de 990 fM, y una reproducibilidad promedio del 21%.

A continuación, se construyó un genosensor para detectar el fragmento de 75 nucleótidos específico de GAPDH, aplicando una estrategia equivalente a la descrita para el CCAT1. De esta forma, se busca normalizar la señal registrada para el CCAT1 y lograr su cuantificación fiable, excluyendo cualquier variación inespecífica. Para el control endógeno se diseñaron 2 sondas de detección marcadas con fluoresceína, pues su cantidad en la muestra se espera que sea superior a la del lncRNA CCAT1. Este genosensor permite detectar GAPDH sintético con un intervalo de respuesta lineal

comprendido entre 10 pM y 1 nM ($I_{net} (\mu A) = (7,3 \pm 0,1) [GAPDH] (nM) + (0,04 \pm 0,05)$; $r = 0,9995$), una reproducibilidad media del 18,5% y un límite de detección de 1,83 pM.

Comparando las características analíticas de ambos genosensores, observamos que la sensibilidad para detectar CCAT1 es 1,34 veces superior a la obtenida para GAPDH, lo que concuerda con la diferencia en el número de sondas de detección empleadas en ambos genosensores: 3 para CCAT1 y 2 para GAPDH. De esta forma, teóricamente, se incorporan 1,5 veces más moléculas de enzima por evento de hibridación en el caso del CCAT1, con el consiguiente aumento de la señal analítica. Estos resultados respaldan la posibilidad de regular la sensibilidad del ensayo ajustando el número de sondas de detección al nivel de expresión del ácido nucleico diana en la muestra.

3.3. Detección de CCAT1 en líneas celulares tumorales

Una vez evaluadas las características analíticas de los genosensores electroquímicos, el siguiente paso consistió en detectar ambos transcritos (CCAT1 y GAPDH) en líneas celulares tumorales. Para ello, seleccionamos la línea celular HT29 derivada de adenocarcinoma de colon humano. Tras extraer el ARN total, comenzamos estimando la abundancia relativa de CCAT1 con respecto a GAPDH mediante PCR cuantitativa con una etapa previa de transcripción inversa (RT-qPCR). Para esta relación se obtuvo un valor de $0,040 \pm 0,001$ que evidencia la necesidad de disponer de un método más sensible para detectar CCAT1 que para determinar GAPDH. En el presente trabajo, se trató de satisfacer este requisito utilizando un número diferente de sondas de detección y, en consecuencia, distinto número de marcadores enzimáticos por molécula diana.

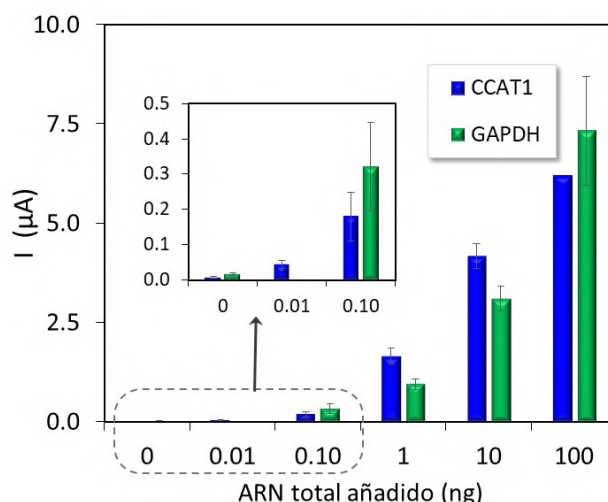


Figura 3. Respuesta de los sensores de CCAT1 (azul) y GAPDH (verde) a los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR, a partir de diferentes cantidades de ARN total extraído de células HT29.

A continuación, enfrentamos el genosensor desarrollado para CCAT1 con ARN total extraído de la línea celular HT29, obteniendo señales que son significativamente

distintas de la registrada para el blanco del calibrado; mientras que para la línea celular LNCaP, que no expresa CCAT1, registramos señales similares a la del blanco, concluyendo que los genosensores son selectivos a la diana para la que fueron diseñados. Sin embargo, encontramos limitaciones de sensibilidad pues el genosensor de CCAT1 permite detectar el lncRNA CCAT1 presente en varios millones de células HT29; pero cabría esperar que los niveles de este lncRNA circulante en plasma humano sean menores que en la línea celular tumoral. Por este motivo, se decidió acoplar los genosensores desarrollados con una etapa previa de transcripción inversa seguida de una PCR de punto final.

Para garantizar la cuantificación fiable de las copias de CCAT1 y GAPDH y, a su vez, la relación entre la cantidad inicial de transcrito y la señal electroquímica obtenida para los productos de PCR, se llevó a cabo la reacción de amplificación en su fase de crecimiento exponencial, evitando que la PCR alcance su fase de saturación. Basándonos en los resultados de RT-qPCR y tratando de detectar la cantidad de lncRNA más baja posible, seleccionamos 30 y 27 ciclos de amplificación para CCAT1 y GAPDH, respectivamente. De esta forma fue posible la cuantificación individual de CCAT1 y GAPDH en un número de células mucho menor (Figura 3).

3.4. Detección de CCAT1 en muestras de plasma

Tras demostrar la capacidad para detectar el lncRNA CCAT1 en las células tumorales HT29 y teniendo en cuenta la falta de patrones para este transcrito, analizamos muestras de plasma de individuos sanos suplementadas con 10 ng de ARN total extraído de las células tumorales.

Para evitar la necesidad de realizar dos amplificaciones independientes, una para cada transcrito, realizamos 28 ciclos de RT-PCR de punto final después de la extracción de ARN de muestras de plasma enriquecidas con diluciones seriadas de 10 ng a 0,01 ng del ARN celular tumoral. Posteriormente, los genosensores para CCAT1 y GAPDH se incubaron con los correspondientes amplicones tras una dilución 1:100 (Figura 4A). La señal neta, restando la obtenida para el plasma, aumenta con la cantidad inicial de ARN total añadida hasta alcanzar la saturación (Figura 4B). Las curvas de respuesta resultantes se ajustan al modelo de Langmuir,

($I = \frac{I_{max} \cdot m_{total\ RNA}(ng)}{K + m_{total\ RNA}(ng)}$), obteniendo las siguientes ecuaciones:

-para CCAT1:

$$I_{neta} (\mu A) = \frac{1,92(\pm 0,17) \cdot m_{total\ RNA}(ng)}{2,31(\pm 0,51) + m_{total\ RNA}(ng)}; R^2 = 0,993$$

-para GAPDH:

$$I_{neta} (\mu A) = \frac{2,29(\pm 0,32) \cdot m_{total\ RNA}(ng)}{0,11(\pm 0,08) + m_{total\ RNA}(ng)}; R^2 = 0,994$$

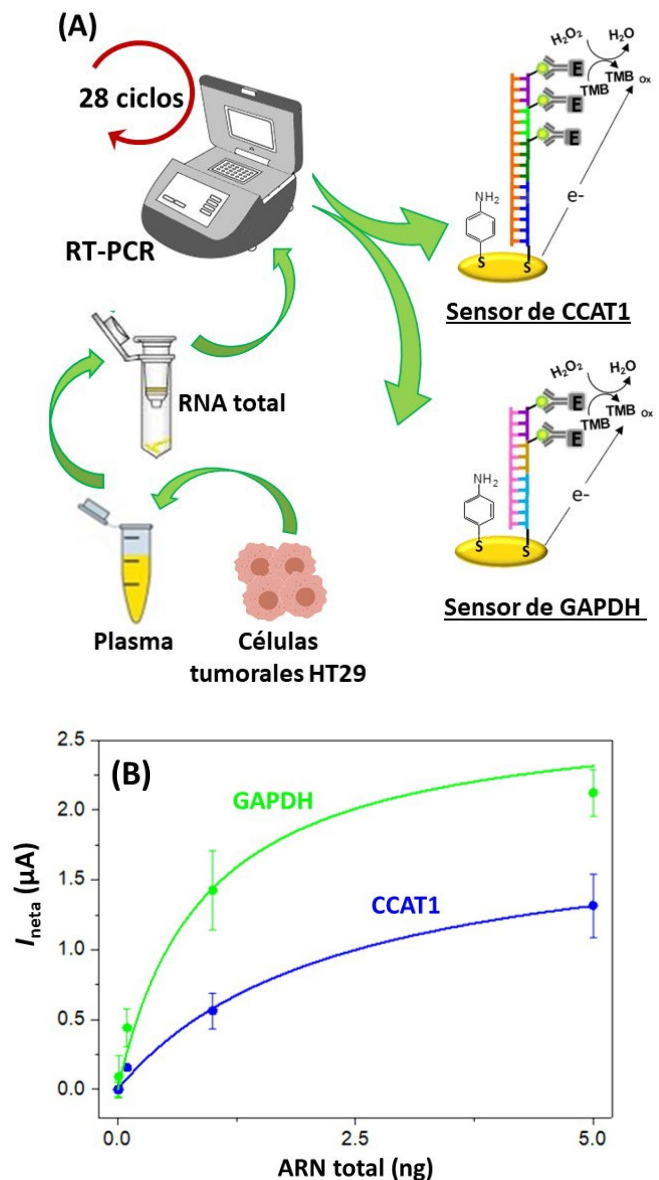


Figura 4. (A) Representación esquemática de la metodología empleada para cuantificar CCAT1 en muestras de plasma. (B) Señales registradas con los genosensores de CCAT1 (azul) y GAPDH (verde) tras una etapa de amplificación mediante RT-PCR (28 ciclos) de muestras de plasma suplementadas con diferentes cantidades de ARN.

La señal de saturación es 1,2 veces mayor para el transcrito de referencia, lo que puede atribuirse a una menor longitud del dúplex anclado en superficie. En cambio, en la región lineal de la curva de respuesta, la pendiente (I_{max}/K) es 25 veces mayor para GAPDH, de acuerdo con un mayor nivel de expresión del transcrito de referencia que de CCAT1 en las células. Esto conduce a una cantidad relativa de CCAT1 respecto a GAPDH en las células HT29 de 0,04, similar al valor obtenido mediante RT-qPCR. Por lo tanto, empleando la relación de señales de ambos sensores, y siempre que las medidas se realicen en la zona de respuesta lineal, es posible estimar la expresión relativa del transcrito diana en relación con el de referencia.

Finalmente, para ilustrar la utilidad de una plataforma electroquímica dual que integra ambos sensores, realizamos la amplificación por RT-PCR (28 ciclos) de las dos dianas simultáneamente en una misma reacción. La respuesta de los genosensores a la mezcla de amplicones no difiere significativamente de la observada para los productos de amplificación obtenidos de forma individual. Estos datos ponen de manifiesto el potencial de los sensores electroquímicos desarrollados para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de CCAT1 en muestras de plasma.

Conclusiones

En este estudio presentamos una plataforma electroquímica para la cuantificación relativa de lncRNAs integrada por dos genosensores para detectar un transcrito específico y una secuencia de referencia. Esta plataforma se ha aplicado al análisis del lncRNA CCAT1, un biomarcador específico de cáncer colorrectal, y el ARN mensajero GAPDH que actúa como control interno, en muestras de plasma enriquecidas con ARN extraído de una línea celular tumoral de cáncer colorrectal. Su acoplamiento con RT-PCR de punto final permitió calcular el nivel de expresión de CCAT1 mediante la relación de señales electroquímicas de los transcritos diana (CCAT1) y referencia (GAPDH). Aunque nos centramos en el CCAT1, nuestro método podría aplicarse a otros lncRNAs asociados a diferentes tumores malignos para los que se ha descrito un nivel de expresión alterado.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Dr. Luis J. García Flórez y al Dr. Daniel Fernández Martínez del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) por las muestras de plasma proporcionadas.

Este trabajo está financiado en la actualidad por el Ministerio de Ciencia y Universidades a través del proyecto RTI-2018-095756-B-I00. Raquel Sánchez Salcedo agradece al Gobierno de España su contrato predoctoral (MCIU-20-PRE2019-087618).

Referencias

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, 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.

[2] Wang KC, Chang HY, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell.* 2011; 43(6):904-14.

[3] (a) Chandra Gupta S, Nandan Tripathi Y, Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 2017; 140(9):1955-1967. (b) Renganathan A, Felley-Bosco E, Long noncoding RNAs in cancer and therapeutic potential. Chapter 7 in *Long Non Coding RNA Biology*, 2017. Springer. Ed: Rao, M.R.S.

[4] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D, Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. *Dis. Markers.* 2017; 2017:7243968.

[5] Yamada A, Yu P, Lin W, Okugawa Y, Boland CR, Goel A, A RNA-sequencing approach for the identification of novel long non-coding RNA biomarkers in colorectal cancer. *Scientific Reports.* 2018; 8:575.

[6] Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Long noncoding RNAs: from genomic junk to rising stars in the early detection of cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411(19):4265-4275.

[7] Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR, Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39(5):1247-63.

[8] (a) Alaiyan B, Ilyayev N, Stojadinovic A, et al. Differential expression of colon cancer associated transcript1 (CCAT1) along the colonic adenoma-carcinoma sequence. *BMC Cancer.* 2013; 13:196. (b) Zhao W, Song M, Zhang J, Kuerban M, Wang H, Combined identification of long non-coding RNA CCAT1 and HOTAIR in serum as an effective screening for colorectal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8:14131-14140.

[9] Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Fernández-Martínez D, García-Flórez LJ, Lobo-Castañón MJ, An electrochemical genosensing platform for the relative quantification of the circulating long noncoding RNA CCAT1 to aid in the diagnosis of colorectal cancer. *Sens. Actuators B Chem.* 2023; 376:132940.

[10] Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Dual electrochemical genosensor for early diagnosis of prostate cancer through lncRNAs detection. *Biosens. Bioelectron.* 2021; 192:113520.