

TECNOLOGÍAS ELECTROANALÍTICAS DE VANGUARDIA PARA PONER EN VALOR EL METILOMA EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO ONCOLÓGICO

Eloy Povedano¹, Víctor Ruiz-Valdepeñas Montiel¹, Rebeca M. Torrente Rodríguez¹, Ana Montero-Calle², María Garranzo-Asensio², Ravery Sebuyoya^{3,4}, Martin Bartosik³, José M. Pingarrón¹, Rodrigo Barderas², Susana Campuzano¹

¹Dpto. de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.
E-mail: elpove01@ucm.es. X(twitter): @GEBEUCM

²Programa de Enfermedades Crónicas, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.
X(twitter): @ProteoFun

³Centro de Investigación de Oncología Molecular Aplicada, Instituto Oncológico Memorial de Masaryk, Brno, República Checa

⁴Centro Nacional de Investigación Biomolecular, Universidad de Masaryk, Brno, República Checa

Abstract

Durante los últimos años hemos asistido a una revolución sin precedentes en el desarrollo y aplicación de nuevas biotecnologías para el estudio y análisis del metiloma, que propulsa un cambio de paradigma médico y la evolución de los diagnósticos y tratamientos generalizados a otros más personalizados, con potencial, no sólo para diagnosticar la enfermedad de forma más temprana y fiable, sino también para administrar las terapias más adecuadas y efectivas en cada caso particular y en el momento oportuno. En este contexto, este artículo presenta los resultados más relevantes obtenidos durante la última década fruto de una investigación colaborativa, enfocada al desarrollo de sistemas de biosensado electroquímico avanzados para poner en valor el potencial del metiloma en el diagnóstico y pronóstico oncológico de precisión a través de la determinación simple y sensible de biomarcadores epigenéticos relevantes: miARNs y procesos de metilación-desmetilación en ácidos nucleicos tanto a nivel global como regional.

1. Introducción

Aunque el aumento de la esperanza de vida y la aparición de factores carcinógenos ha acrecentado la incidencia del cáncer en las últimas décadas, la existencia de esta patología se remonta a tiempos prehistóricos. Ya alrededor del año 400 a.C., Hipócrates acuñó los términos *karkino* y *carcinoma* de los que nació el nombre con el que popularmente se conoce a esta enfermedad, y aunque por aquel entonces ya era posible detectar su naturaleza invasiva y distinguir entre tumores malignos y benignos [1], no fue hasta mucho tiempo después, en el año 1847, cuando la proteína de Bence-Jones, excretada en orina de pacientes con mieloma múltiple, fue desvelada como el primer biomarcador de cáncer [2]. Desde entonces, el descubrimiento de una vasta variedad de entidades moleculares de cualquier nivel ómico, capaces de informar acerca de la aparición, progreso y evolución de cualquier forma en la que se manifieste este conjunto de enfermedades multifactoriales, ha permitido identificar,

estratificar, pronosticar y establecer su seguimiento de forma cada vez más precisa y fiable [3].

Entre ellos, los biomarcadores derivados de alteraciones y cambios genéticos y epigenéticos en células cancerígenas, incluyendo desregulaciones en los ciclos de metilación/desmetilación en ADN y en ARN, tanto codificante como no codificante, incluyendo los micro-ARNs (miARNs), han demostrado una utilidad clínica sin precedentes para establecer la relación definitiva entre su expresión/alteración y esta patología, así como para su detección en las fases más tempranas en las que poder aplicar terapias dirigidas de forma satisfactoria y esperanzadora [4]. Estas entidades, que proporcionan información molecular de enorme interés para el diagnóstico, pronóstico y predicción de todo tipo de enfermedades, pueden ser monitorizadas por una gran variedad de técnicas y metodologías, también en constante evolución y desarrollo, y cada vez más cercanas a satisfacer las exigentes demandas de la medicina de precisión, de carácter personalizado, en la que buena parte de la sociedad actual se encuentra inmersa. Un ejemplo destacado de estas metodologías lo componen las biotecnologías que explotan la transducción electroquímica, que presumen de características ampliamente demostradas para la medida rápida, sensible, reproducible y selectiva de biomarcadores de cualquier naturaleza en todo tipo de escenarios clínicos y especímenes biológicos, y de forma portátil, miniaturizada, inalámbrica, multiplexada, y en el punto de necesidad [5–7] y, por tanto, exentas de barreras y limitaciones para su aplicación rutinaria en los entornos requeridos, independientemente de sus recursos.

En este contexto, el bagaje que caracteriza al Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Universidad Complutense de Madrid (GEBE-UCM) en el diseño, puesta a punto y aplicación real de dispositivos electroanalíticos para la monitorización de marcadores clínicos relevantes en patologías de prevalencia mundial, como el cáncer, en combinación con los conocimientos de biología molecular y proteómica del Grupo de Investigación Unidad de Proteómica Funcional del Instituto de Salud Carlos III (ProteoFun-ISCI) liderado por el Dr. Barderas, y con la experiencia en la aplicación de

tecnologías de amplificación isoterma de ácidos nucleicos del Grupo de Investigación liderado por el Dr. Bartosik en el Instituto Oncológico Memorial de Masaryk (Brno), ha hecho posible la implementación de diversas estrategias vanguardistas para el biosensado de dianas genéticas y epigenéticas moleculares de gran interés y relevancia en la clínica actual. Estas estrategias poseen una gran versatilidad, adaptabilidad, funcionalidad y especificidad. Así, siendo conocedores del estado del arte sobre los procesos de metilación en ADN y en ARN, desde la identificación del primer miARN por Ambros y Ruvkun y su reconocimiento como reguladores distintivos en una gran variedad de enfermedades [8], hasta los procesos de metilación descritos recientemente en miARNs [9, 10], en este artículo se recogen las características y oportunidades más destacables de las tecnologías bioelectroanalíticas con las que hemos contribuido en la última década para la interrogación de marcas epigenéticas directamente asociadas con la aparición y desarrollo de los cánceres de mayor prevalencia y/o mortalidad (cáncer colorrectal, CCR, y glioblastoma), a nivel global y gen-específico, en ADN, ARN y miARNs.

Una de las primeras contribuciones, que demostró el potencial de este tipo de metodologías, se logró en 2014 mediante el desarrollo de una estrategia bioelectroanalítica basada en el empleo de proteínas virales para la determinación simple y sensible de miARNs [11], que fue perfeccionada notablemente en 2016 usando anticuerpos más sensibles y específicos como elementos de (bio)reconocimiento [12, 13]. Este avance motivó la investigación de los patrones de metilación del genoma (o metiloma) como biomarcadores oncológicos emergentes y permitió que en 2018 desarrollásemos las primeras estrategias capaces de detectar metilaciones en ADN [14] que, posteriormente, en 2021, fueron ampliadas a la monitorización de metilaciones en ARN [15]. En la actualidad, nuestra investigación se centra en la detección de estos patrones de metilación directamente en miARNs, cerrando así el ciclo de investigación de los últimos diez años (Fig. 1). Estas metodologías han contribuido de forma notable al esclarecimiento y caracterización molecular del metiloma y a poner de manifiesto el indudable valor diagnóstico, pronóstico y predictivo que brindan estas etiquetas químicas para profundizar en los mecanismos epigenéticos implicados en enfermedades oncológicas.

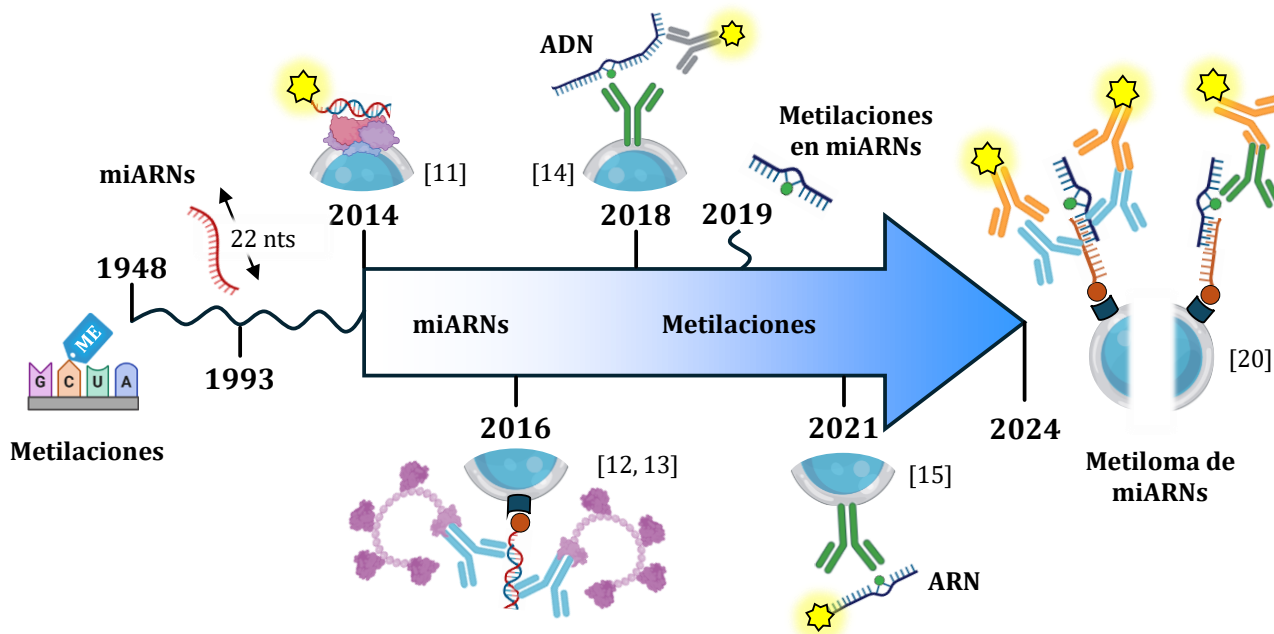


Fig. 1. Diagrama cronológico que resume las diversas estrategias electroanalíticas desarrolladas para la detección de entidades genéticas claves en el avance del diagnóstico y pronóstico oncológico enfocadas a procesos de metilación y miARNs, descritos en 1948 y 1993, respectivamente, y que corroboran los principales avances tecnológicos con los que hemos contribuido en la última década para arrojar luz al potencial del metiloma en la monitorización del cáncer. (Creado con biorender.com). Se indican entre corchetes las referencias citadas al final del artículo en las que se emplean las estrategias representadas.

2. Tecnologías electroanalíticas para avanzar en el diagnóstico y pronóstico oncológico

El desarrollo de tecnologías electroanalíticas innovadoras para el diagnóstico y pronóstico de cáncer se ha logrado mediante la selección de entidades genéticas clave como biomarcadores diana, el diseño de las estrategias de bioensayo más apropiadas para la detección sencilla, rápida, sensible y específica de cada entidad genética y su

optimización exhaustiva para garantizar su aplicación efectiva, simple, robusta y fiable en escenarios biológicos reales mínimamente invasivos.

Las tecnologías desarrolladas (Fig. 2A, B) coinciden en el empleo de: i) μ -transportadores de control magnético (μ -TMs) convenientemente funcionalizados para el anclaje eficiente de los (bio)receptores específicos empleados en cada caso y la subsecuente edificación de los distintos diseños de bioensayo, basados en la combinación de

anticuerpos y ácidos nucleicos, ii) amperometría como técnica de detección, utilizando el sistema peroxidasa de rábano (HRP)/H₂O₂ (sustrato enzimático)/hidroquinona (HQ, mediador redox), y iii) electrodos serigrafados de trabajo sobre cuya superficie se capturan previamente los bioconjugados de control magnético resultantes (Fig. 2C), diseñados para llevar a cabo determinaciones individuales, duales, cuádruples u óctuples, según la aplicación de interés. Dichas tecnologías pueden agruparse tal y como se detalla a continuación:

i) Inmunoplateformas de tipo sándwich, implementadas en la superficie de μ -TMs funcionalizados con grupos carboxílicos (COOH/ μ -TMs) para la detección de 5-metil- (5-mC) y 5-hidroximetil- (5-hmC) citosinas en ADN a nivel global, basadas en el empleo de anticuerpos de captura (AbCs) específicos para la metilación diana y un anticuerpo de detección (AbD), conjugado con la enzima peroxidasa (HRP), dirigido al etiquetado general de ADN de cadena sencilla [14, 16] (Fig. 2A i);

ii) Inmunoplateformas de tipo competitivo directo, construidas sobre μ -TMs funcionalizados con Proteína G (ProtG/ μ -TMs) para la detección, a nivel global, de 5-mC, 5-hmC y N⁶-metiladenosina en ADN (6mA) y en ARN (m6A), utilizando AbCs selectivos a las metilaciones objetivo y secuencias sintéticas doblemente etiquetadas con la metilación de interés, para competir por los limitados sitios específicos de reconocimiento de los AbCs, y con biotina, para su etiquetado enzimático final con un conjugado comercial de estreptavidina-HRP (Strep-HRP) [15, 17] (Fig. 2A ii);

iii) Bioplateformas de ácidos nucleicos con inmunocaptura, para la detección de metilaciones 5-mC y 5-hmC a nivel gen-específico, basadas en el empleo de COOH/ μ -TMs, AbCs selectivos a las metilaciones objetivo y sondas de detección complementarias para la hibridación específica con el gen de interés y marcadas (con biotina o fluoresceína) para su posterior etiquetado enzimático [16, 18] (Fig. 2A iii); y

iv) Bioplateformas de ácidos nucleicos con inmunodetección, para detectar metilaciones 5-mC [14], 5-hmC [19] y m6A [20] a nivel gen-específico, basadas en la captura por hibridación con el gen de interés mediante el empleo de sondas de captura biotiniladas específicas inmovilizadas en la superficie de μ -TMs modificados con estreptavidina (Strep/ μ -TMs), y su posterior reconocimiento con AbDs selectivos a las metilaciones de interés y etiquetado enzimático con anticuerpos secundarios (Fig. 2A iv).

Además, tomando como modelo este último formato de bioensayo, se evaluó la respuesta de la estrategia cuando los AbDs específicos a cada metilación se marcaban enzimáticamente con distintos (bio)reactivos comerciales incluyendo anticuerpos secundarios convencionales, conjugados de una proteína bacteriana (Proteína A, ProtA) de alta afinidad por la región Fc de inmunoglobulinas tipo G (IgG) con 1, 40 u 80 moléculas de HRP, y un polímero conjugado con múltiples moléculas de HRP y fragmentos de anticuerpos específicos a IgGs de ratón y conejo

(Histostar) [19]. Estos resultados, que proporcionaron conocimientos experimentales para poder modular la detectabilidad de la metodología “a la carta” en casi dos órdenes de magnitud, permitieron amplificar significativamente la respuesta obtenida, haciendo posible detectar las epimarcas con resolución de un único nucleótido sin necesidad de realizar tratamientos previos de las muestras ni tediosos procesos de amplificación del material genético.

Fruto del conocimiento y la experiencia adquirida en el desarrollo de todas estas estrategias, recientemente hemos propuesto la primera metodología electroanalítica descrita para detectar de manera simultánea tanto el nivel global de un miARN, como su fracción metilada. Por su relevancia para el diagnóstico y pronóstico de CCR seleccionamos el miARN let7a (miARN-let7a) y su fracción con metilación m6A (m6A-miARN-let7a) [20]. Esta estrategia dual está basada en la hibridación específica del miARN diana, independientemente de si está metilado o no, con una sonda de captura específica de ADN biotinilada, en la captura de los heterohíbridos resultantes en la superficie de Strep/ μ -TMs, y en el marcaje enzimático de los mismos con una mezcla de un AbD capaz de reconocer un epítipo de seis nucleótidos en heterohíbridos de ADN/ARN independientemente de su secuencia (AbD-ADN/ARN) o la epimarca m6A (AbD-m6A) para la detección del contenido total del miARN o de su fracción m6A-metilada, respectivamente, y anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP (Fig. 2B).

3. Aplicación al análisis del metiloma del ADN y ARN

Para la implementación exitosa de las bioplateformas electroanalíticas mencionadas, fue esencial optimizar cuidadosamente todas las variables involucradas en su fabricación y aplicación, así como caracterizar su rendimiento analítico y especificidad con estándares sintéticos adecuados. No obstante, el principal desafío fue demostrar su aplicación para discriminar la expresión de las entidades epigenéticas seleccionadas como objetivos clínicos en los contextos biológicos de diagnóstico más adecuados, considerando el campo de aplicación, la complejidad o la accesibilidad a las muestras. En este sentido y con la finalidad de avanzar hacia un diagnóstico personalizado y en el punto de necesidad se priorizó el uso de muestras mínimamente invasivas y de fácil recolección. Para ello, el empleo de los μ -TMs, electrodos desechables y la detección electroquímica han sido nuestros principales aliados. Los μ -TMs son una potente y versátil herramienta empleada en la biodetección de muestras reales debido a que facilitan la recuperación y concentración eficientes de los analitos diana, minimizan el efecto matriz, reducen los tiempos de ensayo, limitan los procesos de pasivación y ensuciamiento de las superficies electrónicas y hacen que los procedimientos analíticos sean más rápidos, sencillos y compatibles con una mayor frecuencia y automatización de los análisis.

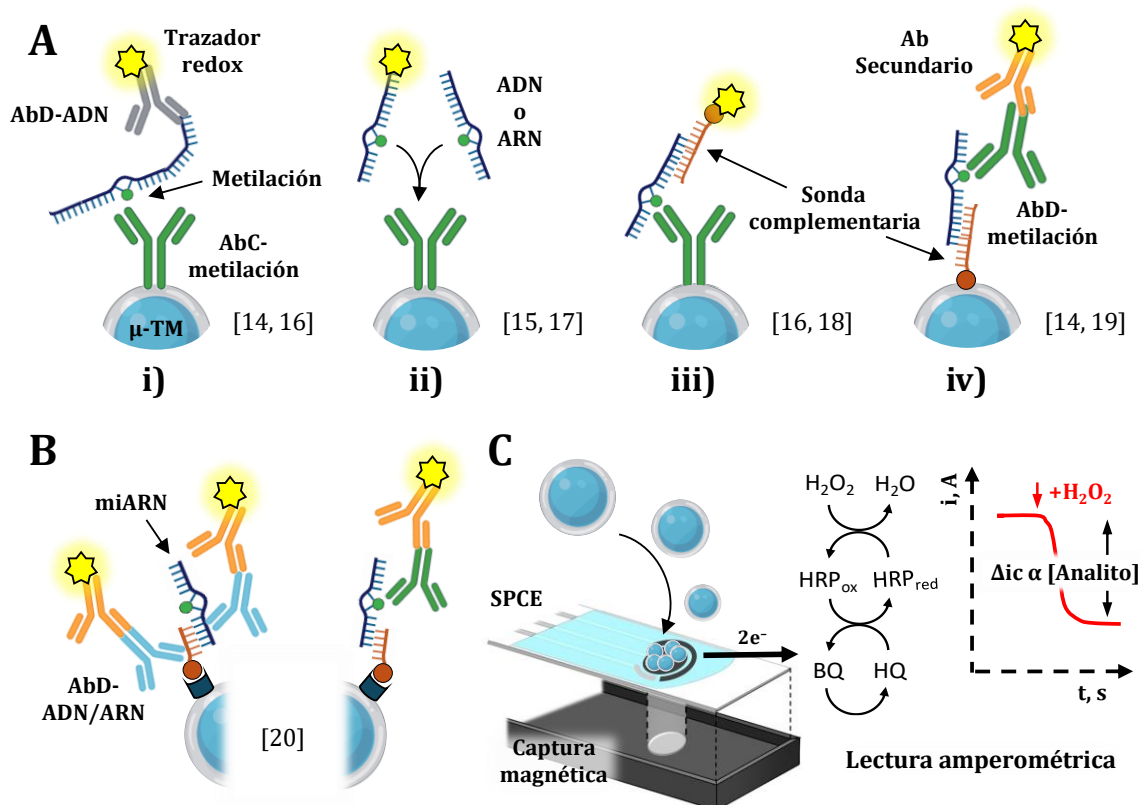


Fig. 2. A) Diagramas esquemáticos de los diferentes bioensayos explorados con las tecnologías desarrolladas: i) inmunoensayo tipo sándwich, ii) inmunoensayo tipo competitivo directo, iii) bioensayo de ácidos nucleicos con inmunocaptura y iv) bioensayo de ácidos nucleicos con inmuno-detección. B) combinación de estrategias para monitorizar tanto el nivel global como la fracción metilada de miARNs, y C) lectura amperométrica. (Creado con biorender.com). Se indican entre corchetes las referencias citadas al final del artículo en las que se emplean las estrategias representadas.

Actualmente, una estrategia muy atractiva y prometedora en biosensado electroquímico y de la que nos hemos servido para el desarrollo de nuestras bioplataformas, ha sido el acoplamiento de los μ-TMs con electrodos serigrafados (SPCE), que pueden producirse en masa de forma sencilla, rápida y a bajo coste, en una amplia variedad de materiales y geometrías y en formatos portátiles, miniaturizados y multiplexados, y que permiten trabajar con volúmenes de muestra muy pequeños. Por tanto, el empleo de μ-TMs funcionalizados con los (bio)receptores adecuados para la captura rápida, sencilla, sensible y selectiva de un biomarcador específico en una muestra compleja, y su posterior acoplamiento magnético a electrodos desechables, en combinación con las ventajas asociadas a la transducción amperométrica, conforman una poderosa alternativa para el desarrollo de herramientas electroanalíticas empoderadas, fiables, sencillas, asequibles y susceptibles de acoplamiento a dispositivos de tipo “glucómetro” para el análisis de muestras reales complejas y para estudiar el papel del metiloma en el diagnóstico y pronóstico de cáncer.

En las siguientes secciones se discutirán brevemente las aportaciones más relevantes de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas.

3.1. Tecnologías bioelectroanalíticas para detectar eventos de metilación en ADN y ARN a nivel global

Las plataformas inmunosensoras descritas en la sección anterior, basadas en los formatos de inmunoensayo tipo sándwich [14, 16] y competitivo directo [15, 17], se aplicaron a la detección individual y/o multiplexada, a nivel global, de los eventos de metilación más relevantes en ADN (5-mC, 5-hmC y 6mA) y ARN (m6A). Las excelentes características analíticas y operacionales alcanzadas con ambas estrategias permitieron realizar análisis exhaustivos en ADN genómico desnaturalizado y en ARN total sin fragmentar, extraídos de tejidos sanos/tumorales pareados de pacientes con CCR y de células cancerígenas con distinto potencial metastásico, respectivamente, necesitando cantidades de muestra notablemente inferiores a las que requieren los kits ELISA comerciales (75–100 ng vs. 0.1–2000 μg), y empleando protocolos más sencillos y tiempos de ensayo considerablemente inferiores (45 min vs. 3–4 h). Los resultados derivados del análisis de estas muestras fueron especialmente relevantes ya que demostraron, de forma pionera, la capacidad de las bioplataformas electroquímicas desarrolladas para discriminar, con la sensibilidad y selectividad clínica requeridas, las muestras de tejido sano o tumoral únicamente a partir

de las respuestas amperométricas proporcionadas, poniendo de manifiesto su potencial como herramientas sencillas y de pronta respuesta en el punto de necesidad para realizar un cribado efectivo y rápido de los pacientes.

3.2. Tecnologías bioelectroanalíticas para detectar eventos de metilación en ADN a nivel gen-específico

A diferencia de los procesos de metilación global, la hipermetilación en regiones específicas de genes es uno de los principales mecanismos que provocan su desactivación. Por ejemplo, los genes *RASSF1A* y *MGMT* son supresores tumorales, que frecuentemente se encuentran silenciados por hipermetilación de su promotor en muchos tumores sólidos humanos. Teniendo en cuenta su relevancia clínica, las bioplataformas desarrolladas para la detección de metilaciones a nivel regional se enfocaron a la detección de los eventos de metilación 5-mC y 5-hmC en las regiones promotoras de ambos genes.

Las estrategias de biosensado de ácidos nucleicos, basadas en el reconocimiento de los híbridos formados a través de procesos de inmuno-captura [16, 18] e inmuno-detección [14, 19], descritas de forma general en el apartado anterior, se aplicaron al análisis de una amplia batería de muestras que incluían células de modelos traslacionales, tejidos tumorales de pacientes con glioblastoma de grado IV y CCR, y biopsias líquidas mínimamente invasivas, como saliva, orina y suero.

Resulta imprescindible destacar su aplicación exitosa para el diagnóstico temprano de pacientes con cáncer de mama y pulmón, mediante el biosensado directo del promotor metilado del gen *RASSF1A* en muestras de suero, sin necesidad de realizar ninguna extracción o amplificación previas del material genético. También merece especial atención su empleo como herramientas de acción terapéutica, mediante la detección de metilaciones en la región promotora del gen *MGMT*, cuya expresión se relaciona con la respuesta del paciente a los tratamientos por quimioterapia basados en agentes alquilantes, lo que pone de manifiesto su potencial para contribuir a la aplicación de una terapia personalizada capaz de predecir con antelación la efectividad del tratamiento.

3.3. Tecnologías bioelectroanalíticas multipropósito para interrogar el contenido total y la fracción metilada de miARNs

La culminación de esta década investigadora llegó con el desarrollo de la primera bioplataforma electroquímica desarrollada a día de hoy para la detección simultánea de un miARN diana y de su fracción metilada [20]. La aplicabilidad de esta bioplataforma dual se demostró analizando el contenido global del miARN-let7a y su fracción m6A-metilada en tan solo 100 ng de ARN total, sin fragmentar ni amplificar, extraído de células cultivadas con distintas capacidades metastásicas y de tejidos de pacientes con CCR en distintos estadios.

A pesar de la limitada cohorte de pacientes analizada, los resultados obtenidos fueron completamente consistentes con lo descrito en la literatura para la desregulación de cada epimarca en CCR. Además, dicha desregulación diferenciada para la expresión o grado de metilación permite una doble confirmación de los resultados y minimiza la obtención de falsos positivos, mejorando así la capacidad de la bioplataforma dual desarrollada para discriminar la agresividad en CCR, aportando pruebas pioneras de la importancia biológica del metiloma de los miARNs en el diagnóstico y estadificación del CCR y demostrando su potencial como herramientas de uso clínico, rápido y sencillo, para llevar a cabo tanto el cribado rápido (≈ 1 h) como la estadificación de los pacientes con este tipo de cáncer.

4. Conclusiones

Aunque la incidencia de enfermedades de elevada prevalencia y mortalidad como el cáncer ha aumentado significativamente en nuestra sociedad en los últimos años por el aumento de la esperanza de vida y la mejora en las herramientas de detección y diagnóstico, su conocimiento se remonta a milenios. Sin embargo, los avances recientes en biotecnología han revolucionado su diagnóstico y tratamiento. Una de estas innovaciones radica en el descubrimiento y en la capacidad de monitorizar una nueva generación de biomarcadores, las alteraciones epigenéticas y en concreto el metiloma de los ácidos nucleicos, con capacidad para transformar la gestión oncológica y abrir nuevas posibilidades para el diagnóstico temprano y el desarrollo de terapias personalizadas.

Este artículo pretende dar una visión general y simplificada de las novedosas y avanzadas tecnologías electroanalíticas desarrolladas durante la última década por nuestro Grupo de Investigación (GEBE-UCM), en colaboración con el Grupo de Investigación ProteoFun-ISCIII y el Grupo de Investigación liderado por el Dr. Bartosik en el Instituto Oncológico Memorial de Masaryk (Brno), para la detección de este tipo de modificaciones tanto a nivel global como gen-específico, en ADN, ARN y miARNs, que pueden resultar cruciales para la comprensión, identificación y seguimiento de esta enfermedad.

Toda la batería de bioplataformas desarrolladas, que pueden revisarse en detalle en sus respectivas publicaciones, han probado su potencial como herramientas electroanalíticas muy atractivas y prometedoras, capaces de aportar soluciones novedosas y eficientes a los retos de la clínica actual, con enormes posibilidades para consolidarse como sistemas avanzados para el descubrimiento, determinación y evaluación rápida, sensible e *in-situ* de este tipo de biomarcadores epigenéticos, que cada vez cobran más importancia en otro tipo de enfermedades prevalentes además del cáncer como las enfermedades neurodegenerativas y las cardiovasculares, para contribuir a su diagnóstico, pronóstico y seguimiento de precisión.

No se puede acabar sin resaltar que la versatilidad de todas estas metodologías y su compatibilidad con determinaciones multiplexadas, ya demostradas en algunas de las investigaciones destacadas [15, 16, 17, 20], hacen factible su transferencia e implementación en plataformas electroquímicas con mayor número de electrodos de trabajo para realizar la determinación simultánea de distintos tipos de metilaciones en el mismo ácido nucleico o la misma metilación en distintos ácidos nucleicos, simplemente cambiando las sondas o los anticuerpos, e incluso el biosensado de otras marcas epigenéticas de relevancia, para continuar esclareciendo y potenciando la importancia del metiloma y el epigenoma en el diagnóstico, pronóstico y terapia clínicos.

Agradecimientos

Se agradece a ICB-CSIC la concesión del premio a la mejor comunicación oral presentada por E.P. en la XXIV SEQA. Asimismo, se agradece el apoyo financiero de los Proyectos de Investigación PID2019-103899RB-I00, PID2022-1363510B-I00 y PID2022-1403070B-I00 financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, del "ERDF A way of making Europe", de las subvenciones PI20CIII/00019 y PI23CIII/00027 del programa AES-ISCIII, al Consejo Checo de Investigación en Salud (n.º NU21-08-00078), el Instituto Nacional de Investigación del Cáncer (Programa EXCELES, Proyecto ID n.º LX22NPO5102), financiado por la Unión Europea Next-Generation EU, Large Research Infrastructure BBMRI.cz (n.º LM2023033), MH CZ-DR0 (MMCI, 00209805) y al contrato del programa INVESTIGO de la Comunidad de Madrid (ref. CT19/23-INVM-55) disfrutado por E.P.

Referencias

[1] G.B. Faguet, A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database, *Int. J. Cancer* 136(9) (2015) 2022–2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>.

[2] H.F.M. Kamel, H.S.B. Al-Amodi, *Cancer Biomarkers*, in M. Wang, F.A. Witzmann (Eds.), *Role of Biomarkers in Medicine*. 2016. ISBN: 978-953-51-2506-8.k <https://doi.org/10.5772/61449>.

[3] Y. Zhou, L. Tao, J. Qiu, J. Xu, X. Yang, Y. Zhang, X. Tian, X. Guan, X. Cen, Y. Zhao, Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy, *Sig. Transduct. Target. Ther.* 9 (2024) 132. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01823-2>.

[4] R.C. Fitzgerald, A.C. Antoniou, L. Fruk, N. Rosenfeld, The future of early cancer detection, *Nat. Med.* 28 (2022) 666–677. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01746-x>.

[5] S. Campuzano, R. Barderas, M.T. Moreno-Casbas, A. Almeida, J.M. Pingarrón, Pursuing precision in medicine and nutrition: the rise of electrochemical biosensing at the molecular level. *Anal. Bioanal. Chem.* 416 (2024) 2151–2172. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04805-5>.

[6] D. Bhatia, S. Paul, T. Acharjee, S.S. Ramachairy, Biosensors and their widespread impact on human health, *Sens. Int.* 5 (2024) 100257. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100257>.

[7] T. D. Pollard, J. J. Ong, A. Goyanes, M. Orlu, S. Gaisford, M. Elbadawi, A.W. Basit, Electrochemical biosensors: a nexus for precision medicine. *Drug Discov. Today* 26 (2020) 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.021>.

[8] M.I. Almeida, R.M. Reis, G.A. Calin, MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers, *Mutat. Res.* 717 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>.

[9] R. Baharudin, N.Q.R. Bakarurraini, I. Ismail, L.H. Lee, N.S. Ab Mutalib, MicroRNA methylome signature and their functional roles in colorectal cancer diagnosis, prognosis, and chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci.* 23(13) (2022) 7281. <https://doi.org/10.3390/ijms23137281>.

[10] M. Konno, J. Koseki, A. Asai, A. Yamagata, T. Shimamura, D. Motooka, D. Okuzaki, K. Kawamoto, T. Mizushima, H. Eguchi, S. Takiguchi, T. Satoh, K. Mimori, T. Ochiya, Y. Doki, K. Ofusa, M. Mori, H. Ishii, Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nat. Commun.* 10 (2019) 3888. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11826-1>.

[11] S. Campuzano, R.M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, R. Granados, J.M. Sánchez-Puelles, J.M. Pingarrón, Magnetobiosensors based on viral protein p19 for microRNA determination in cancer cells and tissues. *Ang. Chem. Int. Ed.*, 53(24) (2014) 6168–6171. <https://doi.org/10.1002/anie.201403270>.

[12] R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, S. Campuzano, M. Farchado-Dinia, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, J.J. Montoya, J.M. Pingarrón, Fast electrochemical miRNAs determination in cancer cells and tumor tissues with antibody-functionalized magnetic microcarriers, *ACS Sens.* 1(7) (2016) 896–903. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00266>.

[13] E. Vargas, R.M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, M. Pedrero, J.J. Montoya, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Magnetic beads-based sensor with tailored sensitivity for rapid and single-step amperometric determination of miRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 18(11) (2017) 2151. <https://doi.org/10.3390/ijms18112151>.

[14] E. Povedano, E. Vargas, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Electrochemical affinity biosensors for fast detection of gene-specific methylations with no need for bisulfite and amplification treatments. *Sci. Rep.* 8 (2018) 6418. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24902-1>.

[15] E. Povedano, M. Gamella, R. M. Torrente-Rodríguez, A. Montero-Calle, M. Pedrero, G. Solís-Fernández, F. Navarro-Villoslada, R. Barderas, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Magnetic microbeads-based amperometric immunoplatform for the rapid and sensitive detection of N6-methyladenosine to assist in metastatic cancer cells discrimination. *Biosens. Bioelectron.* 171 (2021) 112708. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112708>.

- [16] E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Valverde, F. Navarro-Villoslada, P. Yáñez-Sedeño, M. Pedrero, A. Montero-Calle, R. Barderas, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, J. Feilú, J. Camps, E. Rodríguez-Tomás, J. Joven, M. Arenas, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Versatile electroanalytical bioplatfroms for simultaneous determination of cancer-related DNA 5-methyl-and 5-hydroxymethyl-cytosines at global and gene-specific levels in human serum and tissues. *ACS Sens.* 4(1) (2018) 227–234. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01339>.
- [17] E. Povedano, M. Gamella, R. M. Torrente-Rodríguez, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, A. Montero-Calle, G. Solís-Fernández, F. Navarro-Villoslada, M. Pedrero, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, J. Feilú, R. Barderas, J.M. Pingarrón, S. Campuzano, Multiplexed magnetic beads-assisted amperometric bioplatfroms for global detection of methylations in nucleic acids. *Anal. Chim. Acta* 1182 (2021) 338946. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338946>.
- [18] E. Povedano, A. Valverde, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. Pedrero, P. Yáñez-Sedeño, R. Barderas, P. San Segundo-Acosta, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Rapid electrochemical assessment of tumor suppressor gene methylations in raw human serum and tumor cells and tissues using immunomagnetic beads and selective DNA hybridization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57(27) (2018) 8194–8198. <https://doi.org/10.1002/anie.201804339>.
- [19] E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M. Gamella, M. Pedrero, R. Barderas, A. Peláez-García, M. Mendiola, D. Hardisson, J. Feliú, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Amperometric bioplatfroms to detect regional DNA methylation with single-base sensitivity. *Anal. Chem.* 92(7) (2020) 5604–5612. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00628>.
- [20] E. Povedano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, R. Sebuyoya, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Garranzo-Asensio, A. Montero-Calle, J.M. Pingarrón, R. Barderas, M. Bartosik, S. Campuzano, Bringing to light the importance of the miRNA methylome in colorectal cancer prognosis through electrochemical bioplatfroms. *Anal. Chem.* 96(11) (2024) 4580–4588. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05474>.