



## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

---

# **LOS miARNs. IMPORTANCIA CLÍNICA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

---

**Irene Acosta Zurita**

**Tutores:**

**Soledad Carinelli**

**Pedro Ángel Salazar Carballo**

**Departamento de Ciencias Médicas Básicas  
Área de Fisiología Humana  
Departamento de Medicina Física y Farmacología  
Área de Radiología y Medicina Física**

**Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna**

**Curso 2022/2023**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1 MicroARNs circulantes como biomarcadores de enfermedades	6
1.1.1 Cáncer	7
1.1.2 Enfermedad Cardiovascular	8
1.1.3 Enfermedades Hepáticas	8
1.1.4 Enfermedades Neurodegenerativas	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>11</b>
4.1 Importancia clínica de los miARNs en enfermedades neurodegenerativas	11
4.2 Técnicas de detección de microARNs	13
4.2.1 Purificación de miARN	14
4.2.2 Amplificación de ácidos nucleicos	15
4.2.3 Detección	18
4.3 Diseño teórico de un biosensor electroquímico, usando amplificación por HCR, del miARN-146a para la detección precoz de Alzheimer.	20
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>31</b>
Anexo 1. Publicación tipo mini revisión	31

## **TABLA DE ABREVIATURAS:**

- miARNs: microARNs
- EN: Enfermedades neurodegenerativas
- HCR: Reacción en Cadena de Hibridación
- nt: Nucleótidos
- ARNm: ARN mensajero
- LCR: Líquido cefalorraquídeo
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- EP: Enfermedad de Parkinson
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa
- q-PCR: PCR en tiempo real
- cDNA: ADN complementario
- Au: Oro
- HRP: Peroxidasa de rábano picante
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno
- HQ: Hidroquinona
- BQ: Benzoquinona

## RESUMEN

Los microARNs (miARNs) son reguladores génicos postranscripcionales no codificantes y evolutivamente conservados. Desde su descubrimiento en 1993, los miARNs han despertado un gran interés dada su implicación en numerosos procesos biológicos. Además, la alteración de sus niveles de expresión en diversas patologías, como pueden ser las enfermedades neurodegenerativas, ha favorecido el estudio de estas moléculas como marcadores biológicos.

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) engloban un conjunto de patologías de diversa etiología, pero que comparten características y mecanismos comunes que conducen, en última instancia, a la muerte neuronal. El diagnóstico convencional de las EN se basa fundamentalmente en los síntomas, sin embargo, la mayoría de ellos se manifiestan años después de la aparición de la enfermedad, cuando el proceso de neurodegeneración está ya muy avanzado. Esto pone de manifiesto la necesidad de contar con biomarcadores precoces y plataformas de diagnóstico rápido que sean sensibles y permitan llevar a cabo controles preventivos y periódicos en personas con factores de riesgo.

Esta revisión describe la importancia de los miARNs como biomarcadores, abordando los retos de su uso en el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas y explorando el potencial de los biosensores como herramientas diagnósticas. Finalmente, presenta una propuesta de un biosensor electroquímico para la detección del miR-146a (biomarcador asociado a la enfermedad de Alzheimer) empleando una estrategia de amplificación isotérmica por Reacción en Cadena de Hibridación (HCR, por sus siglas en inglés).

## **ABSTRACT**

MicroRNAs (miRNAs) are evolutionarily conserved non-coding post-transcriptional gene regulators. Since their discovery in 1993, miRNAs have aroused great interest due to their involvement in multiple biological processes. In addition, the alteration of their expression levels in various pathologies, such as neurodegenerative diseases, has favoured the use of these molecules as biological markers.

Neurodegenerative diseases (NE) encompass a set of pathologies of diverse etiology, but which share common characteristics and mechanisms that lead to neuronal death. The conventional diagnosis of NE is based mainly on symptoms, however, most of them manifest years after the onset of the disease, when the neurodegeneration process is already well advanced. This highlights the need for early biomarkers and rapid diagnostic platforms that are sensitive and allow preventive and periodic follow-ups in people with risk factors.

This review describes the relevance of miRNAs as biomarkers, addressing the challenges of their use in the early diagnosis of neurodegenerative diseases and exploring the potential of biosensors as diagnostic tools. Finally, it presents a proposal for an electrochemical biosensor for the detection of miR-146a (a biomarker associated with Alzheimer's disease) using an isothermal amplification strategy by Hybridization Chain Reaction (HCR).

# 1. INTRODUCCIÓN

Los microARNs son pequeños fragmentos no codificantes de ácido ribonucleico, de aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud, capaces de regular la expresión génica a nivel postranscripcional. Fueron descritos por primera vez a finales del siglo XX, a raíz del estudio de la regulación del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* <sup>[1,2]</sup>.

Estos pequeños ARNs están ampliamente extendidos en organismos multicelulares, donde participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos, como la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis. Son estructuras muy conservadas entre especies, que se localizan en diferentes regiones del genoma, mayoritariamente en intrones, y con menor frecuencia en exones. Se transcriben como precursores largos, que posteriormente son escindidos a moléculas de ARN de entre 70-100 nucleótidos (nt) con forma de horquilla, llamados pre-miARN. Estas secuencias, son posteriormente escindidas en el citoplasma dando lugar al miARN maduro, que se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN para degradar o modificar la transcripción de su ARN mensajero diana (ARNm) <sup>[3]</sup>. En general, resultan imprescindibles para la regulación de las funciones básicas en prácticamente todos los tipos celulares, constituyendo un mecanismo de control epigenético fundamental a nivel post-transcripcional <sup>[4]</sup>.

En el año 2008, un estudio demostró que la presencia de miARNs no se limitaba al interior celular, sino que demostraron su presencia en el torrente sanguíneo <sup>[5]</sup>. El estudio de estas moléculas, denominadas miARNs circulantes, se ha centrado en su potencial como marcadores biológicos.

## 1.1 MicroARNs circulantes como biomarcadores de enfermedades

Los miARNs están presentes en diversos fluidos corporales, incluyendo suero, plasma, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo (LCR). Son secretados a los fluidos biológicos dentro de microvesículas y exosomas, hecho que les confiere alta resistencia al medio extracelular y estabilidad frente a la acción de las ribonucleasas. Además, se han encontrado órganos con un perfil de expresión

de miARN muy específico, hecho que favorece su uso de los niveles en sangre como indicador del estado de un órgano en particular. Además, cambios producidos en los niveles de expresión de miARNs circulantes se han correlacionado con alteraciones durante el progreso de algunas enfermedades [6].

En este sentido, encontrar biomarcadores que permitan entender el origen y la fisiología de los procesos patológicos [7] resultaría de gran interés con fines diagnósticos. Muchos estudios sobre miARNs se han focalizado en el descubrimiento de biomarcadores en enfermedades neoplásicas, sin embargo, cabe mencionar la importancia de su investigación en otras enfermedades tales como las cardiovasculares, hepáticas o neurodegenerativas.

### **1.1.1 Cáncer**

La detección de miARNs circulantes es una buena alternativa como método de diagnóstico no invasivo del cáncer. Lawrie y colaboradores fueron los primeros en identificar la sobreexpresión de tres miARNs (miR-21, miR-155 y miR-210) en sangre de pacientes con linfoma difuso de células B grandes. Posteriormente se estudió la asociación de niveles altos de miR-21 con un incremento del tiempo entre recidivas (período de supervivencia libre de recaída) [8]. Asimismo, se han descrito miARNs circulantes relacionados con otros tipos de cáncer. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de mama se determinó que los niveles de miR-195 y let-7a estaban muy elevados y que 2 semanas después de la cirugía, los niveles de ambos se reducían significativamente, igualándose con los de pacientes sanos. Además, los perfiles de expresión de estos miARNs fueron comparados con pacientes con otros tumores (como colorrectales, carcinoma de células renales y melanomas). El estudio mostró que el miR-195 sólo se veía sobreexpresado en pacientes con cáncer de mama, lo que demostró la existencia de miARNs circulantes cáncer-específicos [9].

### **1.1.2 Enfermedad Cardiovascular**

Diversos miARNs circulantes han sido propuestos como biomarcadores de patologías cardiovasculares debido a su expresión diferencial en cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y vasculares. Además, muchos de ellos están involucrados en el control de procesos como el remodelado, fibrosis, inflamación, apoptosis, proliferación, y angiogénesis. Los más estudiados están relacionados con el diagnóstico del síndrome coronario, centrándose en el miR-1, miR-133a/b, miR-208a y miR-499, que se encuentran enriquecidos en el tejido miocárdico. Se observó también que la concentración plasmática de estos miARNs aumentaba tras un infarto de miocardio, obteniéndose resultados similares a los indicadores cardíacos convencionales como la troponina T cardíaca de alta sensibilidad <sup>[10]</sup>. Adicionalmente, Cheng y colaboradores identificaron, mediante un metaanálisis, a miR-133a y miR-499 como biomarcadores potenciales de necrosis de miocardio.

### **1.1.3 Enfermedades Hepáticas**

La alteración en la expresión de ciertos miARNs puede estar asociada con la desregulación de un órgano específico, siendo responsable, por ejemplo, de lesiones hepáticas, y/o favoreciendo el desarrollo de tumores <sup>[11]</sup>. El miR-122 es un miARN específico de hígado, expresado por hepatocitos, y fundamental para el mantenimiento de la homeostasis hepática. Varios estudios han demostrado que su inhibición provoca la desregulación de la homeostasis del hierro, de la diferenciación de los hepatocitos, y del metabolismo lipídico sistémico. También se ha demostrado su importancia como supresor tumoral. Desde el punto de vista clínico, sus niveles hepáticos y circulantes son considerados como un marcador pronóstico en pacientes con carcinoma hepatocelular <sup>[12]</sup>.

### **1.1.4 Enfermedades Neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas engloban un conjunto heterogéneo de patologías de diversa etiología, que comparten ciertas características y/o mecanismos que conducen a la neurodegeneración.



El primer microARN que se relacionó con las enfermedades neurodegenerativas fue miR-124, considerado un regulador clave en la diferenciación y función de las células nerviosas del sistema nervioso central. Fang et al. (2012) sugirieron que el miR-124 puede actuar como un factor regulador que disminuye la muerte celular en la Enfermedad de Alzheimer (EA), controlando la expresión de una enzima (BACE-1), que participa en la producción del neurotóxico A $\beta$  <sup>[13]</sup>. Por otra parte, un estudio experimental realizado en 2018 demostró que la expresión de miR-221 estaba disminuida en la enfermedad del Parkinson (EP). Mientras que, la sobreexpresión, promovía la proliferación e inhibía la apoptosis de células dopaminérgicas, concluyendo que miR-221 desempeña un papel protector en la enfermedad del Parkinson <sup>[14]</sup>.

Dada la heterogeneidad de las EN, el diagnóstico de las mismas es complejo y multiparamétrico, considerándose el diagnóstico precoz fundamental para un tratamiento adecuado. Se ha demostrado que varias de estas enfermedades presentan niveles de miARNs alterados. Finalmente, el estudio de los miARNs asociados a EN adquiere una gran relevancia clínica, ya que pueden ser potenciales biomarcadores precoces. Además, su uso en el desarrollo de nuevas estrategias de detección en fluidos biológicos permite el uso de métodos de cribado menos invasivos.

## 2. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica pretende sintetizar y recopilar información acerca de los microARNs y su importancia clínica como biomarcadores precoces en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, se desarrolla una propuesta teórica para la detección de miR-146a, asociado a la EA, combinando una estrategia de amplificación isotérmica con el biosensado electroquímico.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La gran mayoría de artículos utilizados provienen de las bases de datos Pubmed.com, MedlinePlus y Science Direct-Elsevier, donde se han aplicado filtros y se han utilizado las siguientes palabras clave: *miRNA*, *biomarker*, *neurodegenerative disease*, *biosensor*, *nucleic acid amplification*, *Hybridization Chain Reaction*, *miRNA detection*, entre otros términos.

Las secuencias de pre-miR-146a y miR-146a fueron obtenidas de la base de datos Secuencias NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La especificidad de las sondas diseñadas para la captura y amplificación fueron evaluadas mediante alineamiento utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Importancia clínica de los miARNs en enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un proceso de degeneración neuronal gradual a nivel del sistema nervioso, que provoca una pérdida de la funcionalidad e independencia personal. El pronóstico de estas enfermedades depende de factores como la edad, los antecedentes familiares y las influencias genéticas o ambientales.

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia, representando entre un 60-70% de los casos <sup>[15]</sup>. La acumulación de proteínas en la corteza cerebral, y la formación de ovillos neurofibrilares, conducen a un deterioro progresivo de las funciones cognitivas y conductuales del paciente <sup>[16]</sup>. Ante la falta de biomarcadores específicos, el diagnóstico de esta enfermedad se basa en diversos estudios clínicos, similares al de otras demencias. Es un proceso largo y complejo que comprende estudios neuropsicológicos, técnicas de neuroimagen y resonancia magnética que permiten descartar otras enfermedades cerebrovasculares, y/o pruebas de detección complementarias de proteínas  $\beta$ -amiloides y proteína Tau en LCR <sup>[17]</sup>, análisis que requieren punción lumbar.

El segundo trastorno neurodegenerativo más prevalente en la actualidad es la enfermedad de Parkinson. Se caracteriza por una pérdida neuronal dopaminérgica en la sustancia *nigra*, responsable de la alteración en el control del movimiento <sup>[18]</sup>. El diagnóstico diferencial se basa en escalas de valoración clínica de las funciones motoras. El hecho de que el diagnóstico esté basado en la observación de estos síntomas provoca que, al momento del diagnóstico, aproximadamente el 70% de las neuronas dopaminérgicas del paciente ya se hayan perdido <sup>[19]</sup>. Además, los biomarcadores actuales para la EP abarcan proteínas presentes en LCR y tejido cerebral, lo que dificulta la toma de muestras, requiriendo métodos invasivos y en muchos casos imposibles. Esto evidencia la necesidad de identificar nuevos biomarcadores y desarrollar

métodos sensibles que permitan el diagnóstico temprano, mitigando los efectos degenerativos de este tipo de enfermedades.

Los miARNs han sido descritos como una nueva vía de regulación postranscripcional de la expresión genética. Su descubrimiento en el reino animal se llevó a cabo mediante la clonación de secuencias de ADN copias, procedentes de muestras de ARN total fraccionadas por tamaño, provenientes de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* <sup>[20]</sup>. Tras su hallazgo, estas moléculas se agruparon atendiendo a las siguientes características unificadas de expresión y biogénesis: <sup>[20]</sup>

1. Proviene de precursores endógenos
2. Están conservados filogenéticamente
3. No codifican un producto proteico
4. Su expresión es detectada por hibridación

Asimismo, las alteraciones en los patrones de expresión de los niveles celular/tisular de miARNs asociados a procesos patológicos como inflamación o desórdenes neurológicos, mostraron perfiles de expresión únicos que no dependen de la raza, edad o sexo, características que los convierten en excelentes candidatos a biomarcadores de diagnóstico <sup>[20, 21]</sup>.

Un estudio realizado por Khoo et al. en 2009, demostró la eficacia de utilizar miARNs circulantes de plasma como biomarcadores de la enfermedad de Parkinson <sup>[19]</sup>. Para ello, se reclutaron pacientes diagnosticados con EP idiopática pertenecientes al Saint Mary 's Health Care Hauenstein Parkinson's Center e individuos sanos. Se recogieron muestras de sangre periférica para aislar y cuantificar los niveles de ARN total y miARNs. El estudio identificó 9 pares clasificadores predictivos de EP y 13 miARNs con niveles de expresión alterados en pacientes con EP (Tabla 1). De este modo, se comparó grupos controles y con EP, a través de la búsqueda de pares de miARNs cuyos niveles de expresión sean diferenciales. Así, por ejemplo, la interpretación para el primer par (miR-1307/miR-632) fue la siguiente: "Si la expresión de miR-1307

es superior a la de miR-632, se predice que el paciente tiene EP; de lo contrario, se predice que el paciente es un control sano”.

**Tabla 1:** Perfiles de expresión global de miARNs circulantes en plasma de pacientes con EP y controles sanos, según el estudio de Khoo y colaboradores <sup>[19]</sup>.

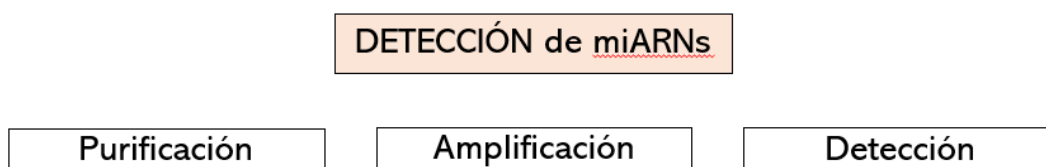
Pares clasificadores predictivos	miARNs expresados diferencialmente en pacientes con EP
miR-1307/miR-632, miR-647/miR-99a, miR-1225-5p/miR-891b, miR-1826/miR-450b-3p, miR-579/miR-708, miR-506/miR-1253, miR-200a/miR-455-3p, miR-192/miR-485-5p, miR-488/miR-518c	miR-1307, miR-647, miR-548b-3p, miR-192, miR-505*, miR-506, miR-626*, miR-1826, miR-572, miR-671-5p, miR-222*, miR-9, miR-1225-5p

\*miR-505, \*miR-626, \*miR-222 presentaron una expresión diferencial mayor. Siendo miR-626 una posible diana de los genes LRRK2 y PARK2, mientras que miR-222 y miR-505 son posibles dianas del gen PARK2.

La identificación de miARNs relacionados con EN podría guiar el desarrollo de nuevas estrategias de detección de estos ácidos nucleicos en fluidos biológicos, permitiendo métodos de diagnóstico temprano menos invasivos y más específicos.

## 4.2 Técnicas de detección de microARNs

La detección de miARNs en fluidos biológicos, requiere métodos precisos, sensibles y reproducibles <sup>[22]</sup>. En general, la elección del método dependerá de la cantidad y calidad de la muestra. La detección de miRNAs consta de tres etapas: purificación, amplificación y detección. (Figura 1).



**Figura 1:** Etapas llevadas a cabo en el proceso de detección de miARNs en muestras biológicas.

### 4.2.1 Purificación de miARN

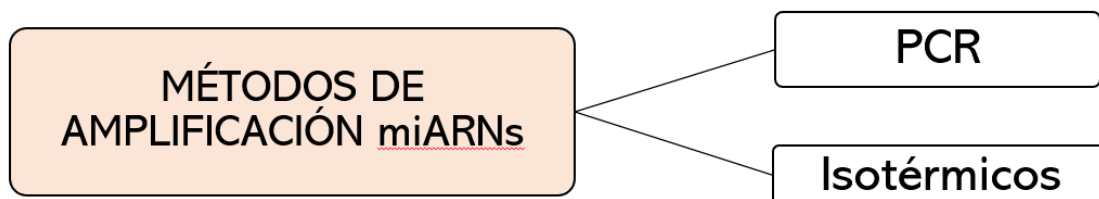
En primer lugar, es fundamental el aislamiento del miARN de la matriz biológica. Esto implica el pre-tratamiento de la muestra, utilizando agentes caotrópicos, detergentes y/o disolventes orgánicos que promueven la lisis de vesículas lipídicas y lipoproteínas [22]. Seguidamente, es necesaria la centrifugación o extracción en fase sólida mediante columnas de afinidad, para eliminar los componentes particulados y restos de la muestra (Tabla 2).

**Tabla 2:** Métodos de purificación de miARNs. Tabla adaptada de Salim et al. [22]

MÉTODOS PURIFICACIÓN miARN	
<b>Precipitación alcohólica</b> (Extracción en fase líquida)	Se basa en la solubilidad diferencial en compuestos alcohólicos. Para ello se añade un alcohol (generalmente etanol o isopropanol) a la muestra de ARN total, provocando la precipitación de los miARNs.
<b>Purificación con membranas de afinidad sílica</b> (Extracción en fase sólida)	Se hace pasar la muestra de ARN total por columnas de sílice. Los miARN se adhieren a las columnas por medio de interacciones hidrofóbicas. Posteriormente, se lava la columna para eliminar contaminantes, y se eluyen los miARNs utilizando una solución salina.

Los métodos de extracción en fase sólida son una alternativa excelente a los métodos de extracción en fase líquida, porque permiten una purificación rápida y eficiente.

Una vez los miARNs han sido purificados, su baja concentración hace necesario, en la mayoría de los casos, el empleo de métodos de amplificación (Figura 2). Las técnicas de amplificación se utilizan para incrementar el número de una secuencia específica de ADN / ARN en la muestra [23].



**Figura 2:** Métodos principales de amplificación de miARNs.

#### 4.2.2 Amplificación de ácidos nucleicos

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es el método de amplificación más utilizado para amplificar ácidos nucleicos. La PCR convencional amplifica exponencialmente un segmento específico de ADN mediante ciclos térmicos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador y elongación. En el caso de muestras de ARN, es necesario un paso previo de retrotranscripción (RT-PCR), para convertir el ARN en ADN <sup>[24]</sup>. Por otro lado, el uso de cebadores fluorescentes permite la cuantificación en tiempo real (q-PCR, también llamada *real time* PCR) de los fragmentos amplificados, gracias a la incorporación de un detector de fluorescencia en el equipo termociclador.

La técnica de RT-PCR en tiempo real (q-RT-PCR), se usa ampliamente en el análisis de miARNs, dada su alta sensibilidad y capacidad para amplificar miARNs a partir de pequeñas cantidades de ARN inicial <sup>[23]</sup>. Sin embargo, es un proceso largo, complejo, y a menudo provoca falsos positivos. Estas desventajas, así como la necesidad de ciclos de temperatura, el elevado coste de los insumos y equipamiento, y la necesidad de técnicos altamente cualificados, que sepan interpretar y analizar los resultados, han propiciado la expansión en el desarrollo de métodos de amplificación isotérmicos.

Estas técnicas (métodos isotérmicos), amplifican los ácidos nucleicos a temperatura constante, evitando el uso de termocicladores <sup>[24]</sup>, haciéndolas más sencillas y económicas. Incluyen una gran variedad de estrategias que difieren en el número y las enzimas empleadas o el diseño de *primers* que intervienen en la amplificación (Tabla 3).

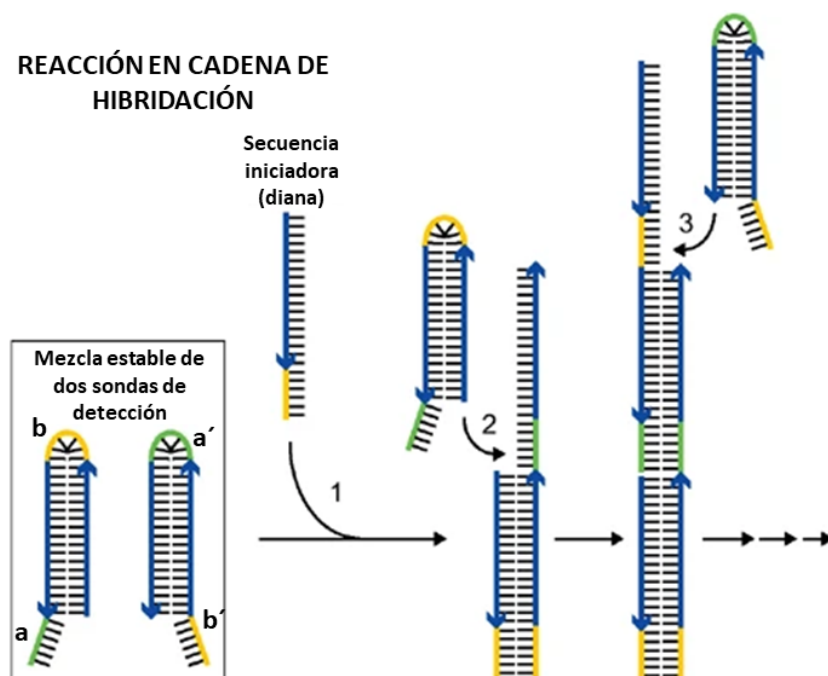
**Tabla 3:** Métodos isotérmicos utilizados en el proceso de detección de miARNs. Tabla elaborada con información obtenida de [23-30].

<b>MÉTODOS ISOTÉRMICOS</b>	
<b>Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)</b>	Este método utiliza una <b>ADN polimerasa</b> con actividad de desplazamiento de hebra y de <b>4 a 6 pares de sondas</b> que forman bucles para crear amplicones concatémicos de gran tamaño que contienen múltiples copias de la diana. LAMP se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre <b>60-65°C</b> . La reacción de amplificación consta de dos pasos: la reacción no cíclica, que conduce a la formación de una cadena de ADN de doble bucle, y la amplificación cíclica y elongación, que conduce a la síntesis de ADN con desplazamiento de la cadena, dando lugar a productos en forma de coliflor que consisten en repeticiones alternativamente invertidas de la secuencia diana en la misma hebra.
<b>Amplificación en círculo rodante (RCA)</b>	Método de amplificación lineal basado en la replicación del genoma circular de plásmidos y bacteriófagos. La amplificación tiene lugar a <b>37°C</b> o a <b>temperatura ambiente</b> , cuando la <b>ADN polimerasa Phi29</b> replica una secuencia de ADN circular una y otra vez, construyendo un producto monocatenario largo repetido en tándem. El aspecto más distintivo de esta técnica es que requiere moléculas de ADN circular. Sin embargo, la RCA no sólo se limita a amplificar ADN circular, sino que puede utilizar sondas que se circularizan, llamadas sondas candado, amplificando secuencias lineales de ARN/ADN. Debido a que el tamaño del círculo es demasiado pequeño para formar una doble cadena alrededor, el nuevo ADN estará formado por una única hebra.
<b>Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA)</b>	Es una estrategia retroviral de amplificación exponencial que imita la replicación del ARN a través de un intermediario de ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés). Se realiza a <b>41°C</b> , utilizando <b>dos sondas</b> específicas para el ARN de interés, y tres enzimas específicas ( <b>transcriptasa inversa, ARN polimerasa</b> y una <b>exonucleasa</b> ). La primera sonda se hibrida con el ARN generando el cDNA gracias a la actividad de la transcriptasa inversa. A continuación, la hebra de ARN es degradada por la exonucleasa, permitiendo la hibridación de la segunda sonda al cDNA.
<b>Reacción en Cadena de Hibridación (HCR)</b>	Método isotérmico más utilizado en la actualidad. <b>No requiere</b> de la utilización de <b>enzimas</b> , sino que la amplificación se inicia en presencia de la molécula iniciadora (por ejemplo, miARN diana). Se emplean <b>dos sondas de ARN, con estructura de horquilla</b> , con extremos complementarios que, en ausencia de la molécula iniciadora coexisten de forma estable. Cada una de ellas está formada por una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia diana y otra secuencia complementaria a una sonda de iniciación. La presencia de la secuencia diana desencadena una reacción en cadena de reconocimiento e hibridación entre las dos sondas, resultando en la formación de una secuencia lineal larga.



La reacción en cadena de hibridación (HCR), descrita por primera vez en 2004 por Drinks y Piece, implica la amplificación de una molécula de ARN diana que es usada como molécula iniciadora de dicha amplificación. Es un nuevo método de amplificación que no utiliza enzimas. En este procedimiento, el ADN/ARN diana inicia una cascada de hibridación entre dos secuencias con estructura de horquilla, con extremos complementarios <sup>[28]</sup>.

El proceso comienza cuando el ADN/ARN diana se une a las sondas de detección formando una cadena de hibridación. De esta manera, la amplificación de la señal se produce a través del desplazamiento de las dos horquillas a lo largo de la cadena de hibridación (Figura 3). De este modo, se consigue la amplificación indirecta de la molécula diana a través de la producción de una hebra lineal de secuencias repetidas de las dos sondas (S1 y S2) concatenadas. En ausencia del ARN de interés, las dos sondas quedan intactas y en equilibrio. La modificación de estas sondas con moléculas fluorescentes, biotina, ferroceno, enzimas etc. permite su acoplamiento a distintos sistemas de detección <sup>[31]</sup>.



**Figura 3:** Esquema básico de la Reacción en Cadena de Hibridación. 1) Iniciación de la amplificación en presencia del ARN diana. 2) Hibridación secuencial y en cadena de las sondas S2 y S1 generando una hebra lineal de secuencias repetidas de S1 y S2 concatenadas. Imagen adaptada con permiso de Evanko, D. Revista Nature Methods (Vol.1 No.3 pág 186) <sup>[30]</sup>.

### 4.2.3 Detección

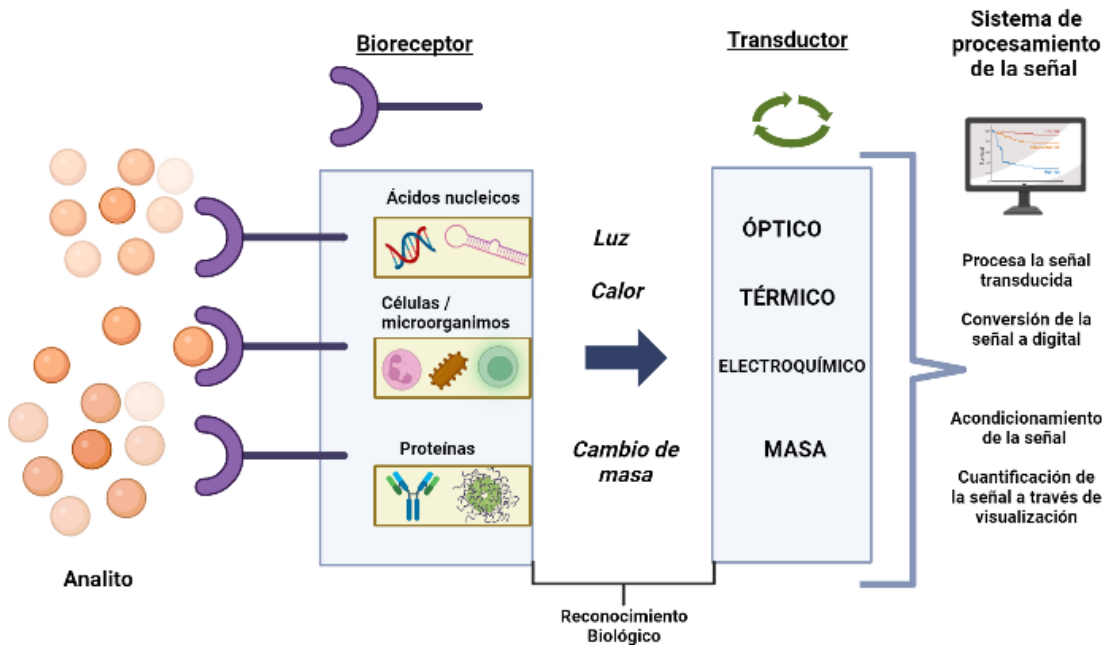
Las técnicas de amplificación deben integrarse en plataformas de detección que permitan la correcta identificación de la secuencia específica amplificada. Para ello, se pueden utilizar métodos de detección convencionales (Tabla 4); u optar por estrategias más simples como el desarrollo de biosensores.

**Tabla 4:** Ventajas y desventajas de los métodos convencionales de detección de miARNs. Elaborada a partir de la información contenida en [32,33].

MÉTODOS CONVENCIONALES DE DETECCIÓN miARNs		
MÉTODO	PRINCIPIO	VENTAJAS Y DESVENTAJAS
<b>NORTHERN BLOTTING</b>	Método de referencia en la detección de miARNs [34]. Se basa en <u>hibridación molecular</u> y <u>electroforesis en gel</u> . El ARN se desplaza bajo acción de un campo eléctrico, separándose en fragmentos de diferentes longitudes atendiendo a su peso molecular. Las moléculas se transfieren a una membrana donde una sonda de detección hibrida el miARN produciendo una señal que es detectada por quimioluminiscencia	<p><b>Ventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Método fiable y específico</li> <li>- No requiere de aparatos complejos</li> <li>- Económicamente rentable</li> </ul> <p><b>Desventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poco sensible, requiere muchos pasos y mucho tiempo</li> <li>- Es necesaria una gran cantidad de ARN</li> <li>- Método exclusivamente cuantitativo pues no distingue entre miARNs del mismo peso molecular</li> </ul>
<b>MICROARRAYS</b>	Se trata de una <u>hibridación en fase sólida</u> de miARNs marcados con fluorescencia a través de sondas de oligonucleótidos formando un arreglo de múltiples secuencias de miARNs distintos. La detección de la señal es mediante la medida de fluorescencia tras la hibridación de la muestra. Aporta información cuantitativa sobre el miARN en cada punto.	<p><b>Ventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite analizar la expresión de miles de genes simultáneamente.</li> <li>- Técnica muy específica</li> <li>- Relativamente rápida y automatizable</li> </ul> <p><b>Desventajas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Requiere de una alta inversión en equipos, tecnología y reactivos</li> <li>- Interpretación de los resultados compleja</li> <li>- Necesario conocimiento previo del gen de interés, para seleccionar la sonda adecuada</li> </ul>

En los últimos años, varios tipos de biosensores han sido desarrollados para detectar miARNs de manera precisa. Un biosensor es un dispositivo electrónico utilizado para transformar una interacción biológica en una señal eléctrica [35]. Están formados por dos componentes: un elemento de bioreconocimiento que interacciona selectivamente con el analito de interés y un sistema de transducción que convierte la interacción en una señal analítica (Figura 4). Ambas partes se encuentran en contacto, formando la misma unidad, generalmente de pequeño tamaño [35].

En los biosensores de miARN, el elemento de bioreconocimiento suele ser una secuencia complementaria al miARN diana [36]. La hibridación entre ambos se transduce a una señal medible, generalmente mediante el uso de marcadores redox.



**Figura 4:** Representación esquemática de un biosensor mostrando los dos componentes: 1) El elemento de reconocimiento incluye distintos tipos de receptores, que tras la interacción con el analito genera un cambio físicoquímico reconocido por 2) el transductor que puede ser de distintos tipos. El transductor procesa ese cambio en una señal medible [37,38].

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo al tipo de transductor (electroquímico, óptico, térmico, de masa, entre otros) [35]. La transducción electroquímica ofrece diversas ventajas destacando una alta sensibilidad, la sencilla miniaturización y el bajo coste de producción ya que no requiere de instrumentación costosa para la lectura. Los biosensores electroquímicos pueden clasificarse según el tipo de señal que detecte (véase Tabla 5).

**Tabla 5:** Clasificación de los biosensores electroquímicos atendiendo al modo en que la señal generada por el transductor es medida. Tabla adaptada de Thévenot et al. [35].

<b>BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS</b>	
<b>Amperometría</b>	Se basa en la medida de intensidad de corriente resultante de la oxidación (o reducción) de un compuesto electroactivo sobre la superficie del electrodo. Se realiza manteniendo un potencial constante durante un tiempo determinado o aplicando un barrido de potenciales sobre un electrodo de trabajo con respecto a un electrodo de referencia. La corriente resultante está directamente correlacionada con la concentración de la especie electroactiva.
<b>Potenciometría</b>	Se basan en la determinación de la diferencia de potencial entre un indicador y un electrodo de referencia, o dos electrodos de referencia separados por una membrana cuando no fluye corriente significativa entre ellos.

### **4.3 Diseño teórico de un biosensor electroquímico, usando amplificación por HCR, del miARN-146a para la detección precoz de Alzheimer.**

El miARN-146a se encuentra abundantemente expresado en las neuronas del cerebro humano. Se considera el modulador clave de la respuesta inmunitaria y se relaciona con procesos de neuroinflamación [39]. Diversos estudios han demostrado que el nivel de expresión de miR-146a aumenta durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo su participación en la progresión de la misma. Una investigación, llevada a cabo en el año 2021 [39], demostró que miR-146a favorecía la deposición de A $\beta$  (componente principal de las placas amiloides), al desencadenar el estrés oxidativo a través de la activación de la vía de señalización MAPK.

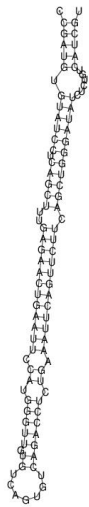
Dada la importancia clínica que presenta este miARN en la EA, a continuación, se describe una propuesta teórica para su detección.

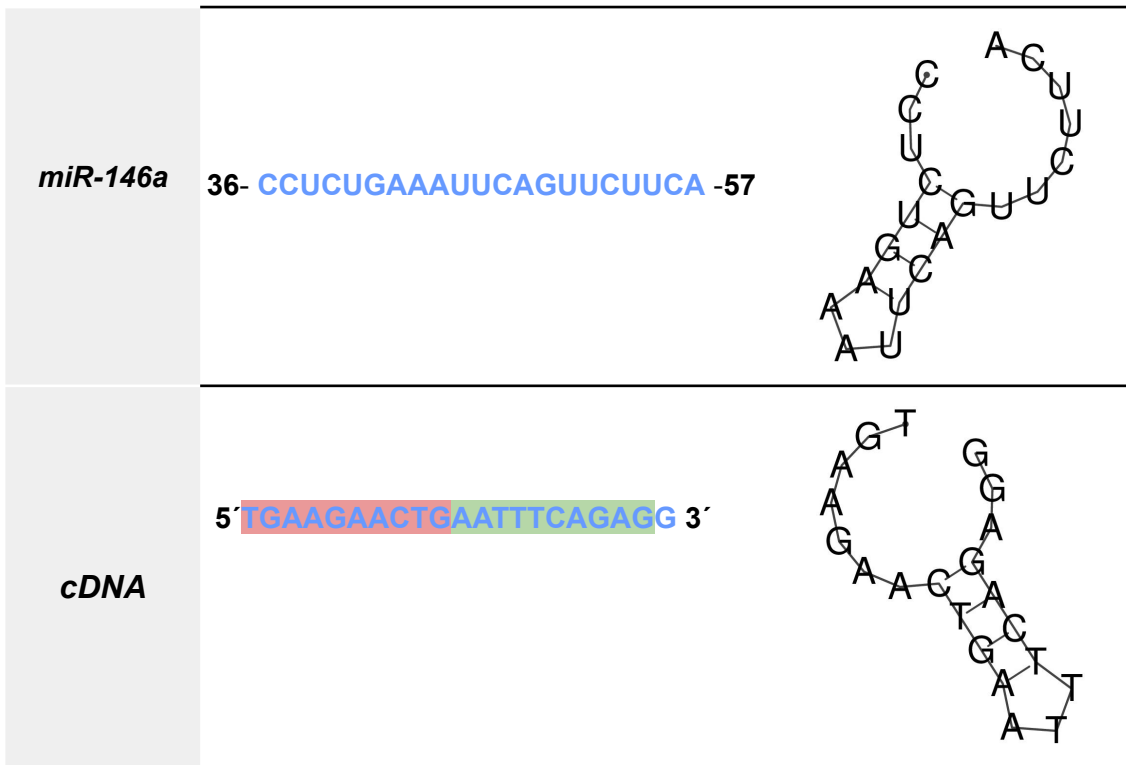
Las secuencias pre-miR146a, del miR-146a maduro, han sido extraídas de microRNA Gene Database (<https://mirgenedb.org/>), y de National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mientras que las estructuras secundarias se extrajeron de Vector Builder (<https://en.vectorbuilder.com/tool/dna-secondary-structure.html>).

Las dos secuencias están escritas en sentido 5' → 3' y se detallan en la Tabla 6. El fragmento correspondiente al miR-146a maduro está resaltado en azul para su fácil identificación.

En esta propuesta, y siguiendo los protocolos usados en los métodos de referencia para la detección de miRNA, se propone la purificación de los fragmentos pequeños de ARN y la retrotranscripción de los mismos, para generar moléculas de ADN cuya estabilidad es mayor. Por esta razón, la estrategia de amplificación isotérmica y posterior detección electroquímica fue diseñada de forma que la secuencia diana de miR-146a es la correspondiente al cDNA del mismo (es decir la reversa y complementaria del miR-146a) como se expone a continuación:

**Tabla 6:** Secuencia de nucleótidos y estructura secundaria de pre-miR-146a, miR-146a y secuencia diana (correspondiente al cDNA del miR-146a). Las estructuras secundarias han sido elaboradas con Vector Builder.

<b>Molécula</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Estructura secundaria</b>
<b>pre-miR146a</b>	<p>5'CCGAUGUGUAUCCUCAGCUUUGAGA            ACUGAAUUCCAUGGGUUGUGUCAGUG            UCAGACCUCUGAAAUUCAGUUCUUCA            GCUGGGAUAUCUCUGUCAUCGU 3'</p>	

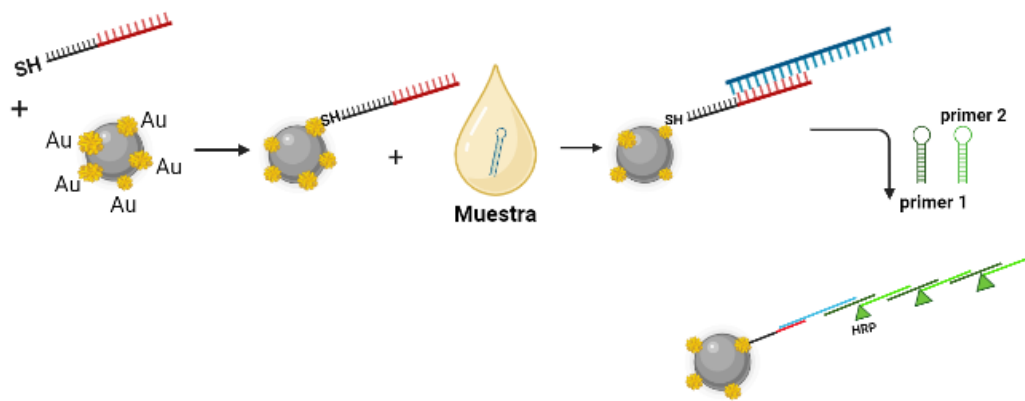


La propuesta de detección mediante biosensado utilizando una amplificación por HCR consta de tres pasos:

1. Captura del cDNA usando partículas magnéticas modificadas con un oligonucleótido de captura.
2. Amplificación por HCR usando sondas marcadas
3. Detección electroquímica indirecta mediante enzimas redox

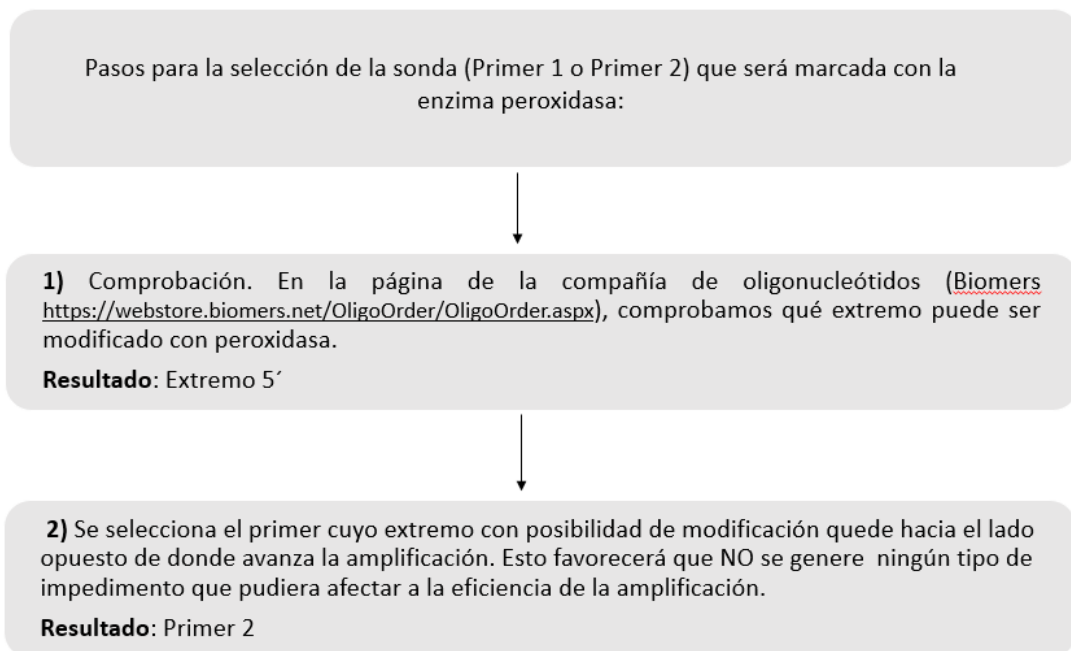
**1) Captura:** Se propone utilizar partículas modificadas con oro (Au) para facilitar la biofuncionalización de las mismas con sondas de captura modificadas con un grupo funcional –SH en el extremo 3' (Figura 5). La sonda de captura propuesta es la siguiente.

<b>Sonda de captura de miARN maduro:</b>	5' <b>CAGTTCTTCA</b> -CCCCCC-SH 3'
--	------------------------------------



**Figura 5:** Esquema del proceso de captura y amplificación del cDNA de miR-146a utilizando partículas modificadas con oro.

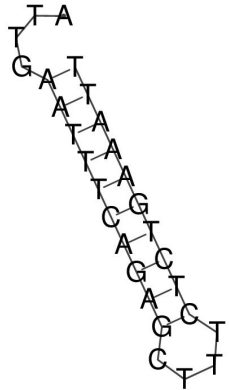
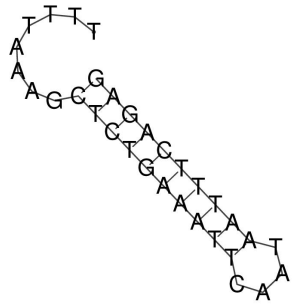
**Amplificación:** La estrategia de amplificación por HCR utiliza dos sondas de detección en forma de horquilla. Para el diseño de las sondas se ha realizado un estudio en las bases de datos de ARN para determinar la especificidad de la secuencia de amplificación elegida mediante una herramienta de búsqueda de alineamiento (BLAST). Asimismo, el paso de detección requiere que una de las sondas utilizadas esté marcada en un extremo con la enzima HRP (Peroxidasa de rábano picante). La selección de la sonda a marcar se realizó siguiendo los pasos descritos en la Figura 6.



**Figura 6:** Esquema explicativo de la selección de la sonda marcada.

La Tabla 7 detalla la secuencia de las sondas diseñadas para la amplificación isotérmica por HCR para miR-146a.

**Tabla 7:** Secuencia y estructura de las sondas diseñadas para la amplificación isotérmica por HCR.

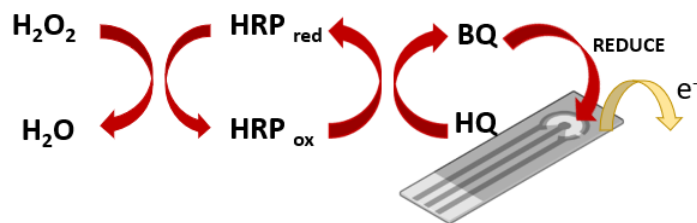
<p><b>Primer 1:</b></p> <p>5' <b>ATTG</b>AATTCAGAG<b>CTTT</b>CTCTGAAATT 3'</p>	
<p><b>Primer 2:</b></p> <p>5'(HRP)TTTT<b>AAAG</b>CTCTGAAATT<b>CAAT</b>AATTCAGAG 3'</p>	

**2) Detección electroquímica:** El proceso de detección se realiza de forma indirecta midiendo la actividad redox de la enzima peroxidasa por amperometría. La determinación de la actividad de la HRP utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como sustrato enzimático e hidroquinona (HQ) como mediador para transportar electrones entre el electrodo y la enzima HRP.

La reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  por la HRP acopla la oxidación de hidroquinona a benzoquinona (BQ), restableciendo el estado original de la HRP. Finalmente, la BQ es reducida en el electrodo tras la aplicación de un potencial de reducción (Figura 7). La corriente generada sobre el electrodo de trabajo es directamente proporcional a la cantidad de



enzima unida a la muestra. Por tanto, los incrementos de corriente pueden correlacionarse con las concentraciones de miARN presente en la muestra.



**Figura 7:** Reacciones redox que ocurren en la determinación electroquímica de la actividad de la HRP.

## **5. CONCLUSIONES**

Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN que participan en multitud de procesos biológicos. Su hallazgo en fluidos extracelulares y la alteración de sus perfiles de expresión en ciertas patologías, los han convertido en biomarcadores muy prometedores de distintas enfermedades.

Estas moléculas han despertado un gran interés en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas cuya sintomatología es muy diversa y cuyo diagnóstico requiere de múltiples y complejas evaluaciones médicas. Además, en este conjunto de patologías la aparición de los síntomas ocurre años más tarde del inicio de la enfermedad, llevando a una gestión y acceso al tratamiento tardíos. La identificación de miARNs asociados a EN en etapas tempranas, posibilitan el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que consigan detectar la enfermedad de manera precoz, ralentizando la aparición de los síntomas y aumentando la calidad de vida del paciente.

Los biosensores son una herramienta útil gracias a su simplicidad, bajo coste y versatilidad para integrarse en distintas plataformas. La incorporación de estos dispositivos para la detección de biomarcadores en el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas, podría convertirse en una herramienta de gran potencialidad en el futuro. El diagnóstico temprano en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson permitiría reducir los efectos devastadores en las familias y pacientes, dándoles acceso más rápidamente a las terapias farmacológicas y no farmacológicas disponibles, manteniendo durante más tiempo la autonomía del afectado, y mejorando, por tanto, la calidad de vida de pacientes y allegados.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Giner M., Montoya M.J., Vázquez M.A., Miranda C., Miranda M.J., Pérez-Cano R.. ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2016 Mar; 8(1): 40-44.
- (2) Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease: History, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol* . 2014; 51(4):759–74.
- (3) Wienholds E, Plasterk RHA. MicroARN function in animal development. *FEBS Lett.* 2005; 579(26):5911–22.
- (4) de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Biomarcadores epigenéticos y enfermedad cardiovascular: los microRNA circulantes. *Rev Esp Cardiol.* 2017; 70(9):763–9.
- (5) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microARNs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(30):10513–8.
- (6) Díez Planelles C. MicroARNs circulantes como biomarcadores emergentes para la progresión de la enfermedad de Huntington. Universidad de Oviedo; 2015.
- (7) Forero-Forero JV, Universidad del Valle, González-Teshima LY, Cabal-Herrera AM, Ramírez-Cheyne J, Castillo-Giraldo A, et al. Surgimiento de los micro-ARN como biomarcadores potenciales en diversas enfermedades. *IATREIA.* 2016; 29(3):323–33.
- (8) Arroyo-Rodríguez AB, Salloum-Asfar S. MICROARNS CIRCULANTES: ¿NUEVOS BIOMARCADORES EN CANCER?. [Digitum.um.es](http://Digitum.um.es).
- (9) Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist.* 2010; 15(7):673–82.
- (10) Eitel I, Adams V, Dieterich P, FueARNu G, de Waha S, Desch S, et al. Relation of circulating MicroRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2012; 164(5):706–14.

- (11) Wang X, He Y, Mackowiak B, Gao B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut*. 2021; 70(4):784–95.
- (12) Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther*. 2015;15(2):142–50.
- (13) Fang M, Wang J, Zhang X, Geng Y, Hu Z, Rudd JA, et al. The miR-124 regulates the expression of BACE1/ $\beta$ -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicol Lett*. 2012; 209(1):94–105.
- (14) Li L, Xu J, Wu M, Hu JM. Protective role of microRNA-221 in Parkinson's disease. *Bratisl Lek Listy*. 2018;119(1):22–7.
- (15) Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*. 2015;6(35):37043–53.
- (16) Zhao Y, Zhang Y, Zhang L, Dong Y, Ji H, Shen L. The Potential Markers of Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. 2019;10(6):1293–301.
- (17) Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2012;235(2):491–6.
- (18) Conoce la enfermedad. Federación Española de Parkinson. 2017.
- (19) Khoo SK, Petillo D, Kang UJ, Resau JH, Berryhill B, Linder J, et al. Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2012;2(4):321–31.
- (20) Ávila-Moreno F, Urrea F, Ortiz-Quintero B. MicroRNAs en el diagnóstico y prognosis del cáncer pulmonar. *Rev Invest Clin*. 2011;63(5):516-535.
- (21) O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroARN-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1604–9.
- (22) Salim H, Pero-Gascon R, Pont L, Giménez E, Benavente F. A review of sample preparation for purification of microRNAs and analysis by mass spectrometry methods. *Microchem J*. 2022;182(107849):107849.
- (23) Li T, Duan R, Duan Z, Huang F, Xia F. Fluorescence signal amplification strategies based on DNA nanotechnology for miRNA detection. *Chem Res Chin Univ*. 2020;36(2):194–202.

- (24) Ben Aissa Soler A. Rapid diagnostic test for the detection of communicable diseases. Universitat Autònoma de Barcelona; 2020.
- (25) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
- (26) Abdullah Al-Maskri AA, Ye J, Talap J, Hu H, Sun L, Yu L, et al. Reverse transcription-based loop-mediated isothermal amplification strategy for real-time miARN detection with phosphorothioated probes. *Anal Chim Acta.* 2020;1126:1–6.
- (27) NASBA — [Internet]. PreTect. Disponible en: <https://www.prect.no/nasba>
- (28) Xu Y, Zheng Z. Hybridization chain reaction for direct mRNA detection without nucleic acid purification. *Methods Mol Biol.* 2018; 1649:187–96.
- (29) Wu J, Lv J, Zheng X, Wu Z-S. Hybridization chain reaction and its applications in biosensing. *Talanta.* 2021; 234(122637):122637.
- (30) Evanko D. Hybridization chain reaction. *Nat Methods.* 2004; 1(3):186–186.
- (31) Bi S, Yue S, Zhang S. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2017;46(14):4281–98.
- (32) Kilic T, Erdem A, Ozsoz M, Carrara S. microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. *Biosens Bioelectron.* 2018;99:525–46.
- (33) Graybill RM, Bailey RC. Emerging biosensing approaches for microRNA analysis. *Anal Chem.* 2016;88(1):431–50.
- (34) Wang Z, Yang B. Northern blotting and its variants for detecting expression and analyzing tissue distribution of miRNAs. En: *MicroRNA Expression Detection Methods.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 83–100.
- (35) Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification<sup>1</sup>International union of pure and applied chemistry: Physical chemistry division, commission I.7 (biophysical chemistry); Analytical chemistry division, commission V.5 (electroanalytical chemistry).1. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2001;16(1–2):121–31.

- (36) Johnson BN, Mutharasan R. Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges. *Analyst*. 2014; 139(7):1576–88.
- (37) Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem*. 2016;60(1):1–8.
- (38) Shabaninejad Z, Yousefi F, Movahedpour A, Ghasemi Y, Dokanehiifard S, Rezaei S, et al. Electrochemical-based biosensors for microRNA detection: Nanotechnology comes into view. *Anal Biochem*. 2019;581(113349):113349.
- (39) Zhan-Qiang H, Hai-Hua Q, Chi Z, Miao W, Cui Z, Zi-Yin L, et al. miR-146a aggravates cognitive impairment and Alzheimer disease-like pathology by triggering oxidative stress through MAPK signaling. *Neurol (Engl Ed)*. 2021.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Publicación tipo mini revisión**

Revista: BioMedical. Journal of Scientific & Technical Research

Título: *miRNAs and their Applications in Neurodegenerative Diseases Detection: An Electrochemical Approach.*

# miRNAs and their Applications in Neurodegenerative Diseases Detection: An Electrochemical Approach

Irene Acosta Zurita, José Luis González Mora, Pedro A Salazar-Carballo\* and Soledad Carinelli

Senior Advisor, Country and Community Support for Impact, CCS4i Team, Switzerland

\*Corresponding author: Pedro A Salazar-Carballo Faculty of Health Sciences, University of La Laguna, Campus de Ofra s/n, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain

## ARTICLE INFO

**Received:** 📅 May 03, 2023

**Published:** 📅 June 01, 2023

**Citation:** Irene Acosta Zurita, José Luis González Mora, Pedro A Salazar-Carballo and Soledad Carinelli. miRNAs and their Applications in Neurodegenerative Diseases Detection: An Electrochemical Approach. Biomed J Sci & Tech Res 50(5)-2023. BJSTR. MS.ID.008003.

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are extensively studied noncoding and conserved post-transcriptional gene regulators in the genome. Since their discovery in 1993, miRNAs have gained significant interest due to their involvement in numerous biological processes. In addition, their altered expression levels in various diseases have led to the study of their potential use as biological biomarkers in several pathologies, including neurodegenerative pathologies. Neurodegenerative diseases (NDs) encompass a diverse group of pathologies of diverse etiology, but they share common features and mechanisms leading to neuron destruction and death. The conventional diagnosis of ND involves a comprehensive clinical examination, consideration of the patient's medical history, neuroimaging and MRI techniques, and clinical laboratory tests. However, most ND symptoms become evident up to 10-15 years after disease onset. This highlights the need for early biomarkers and rapid diagnostic platforms that are sensitive and enable periodic preventive controls in people with risk factors. This mini review addresses the challenges in the clinical diagnosis of neurodegenerative diseases and explores the potential of miRNAs as early biomarkers for detecting ND. In addition, the development of electrochemical biosensors and bioassays for specific targets are presented in this revision.

**Keywords:** Neurodegenerative Diseases; Biomarker; Point-of-Care; Micrnas; Biosensor

**Abbreviations:** NDs: Neurodegenerative Diseases; WHO: World Health Organization; AD: Alzheimer Diseases; CSF: Cerebrospinal Fluid; RNA: Ribonucleic Acid; PD: Parkinson's Disease; PCR: Polymerase Chain Reaction; PoC: Point-of-Care; SPE: Screen-Printed Electrode; CSF: Cerebrospinal Fluid; GoX Graphene Oxide; SWCNTs: Single-Walled Carbon Nanotubes

## Neurodegenerative Diseases

Neurodegenerative diseases (NDs) are characterized by the gradual degeneration and destruction of motoneurons. Neurodegenerative diseases involve processes such as protein aggregation and/or degradation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and bioenergetic damage [1]. Conformational changes in protein sequences lead to the accumulation of misfolded proteins both inside and outside of the cells. The most relevant NDs include Alzheimer's disease (characterized by abnormal tau protein phosphorylation), Parkinson's disease (marked by intraneuronal

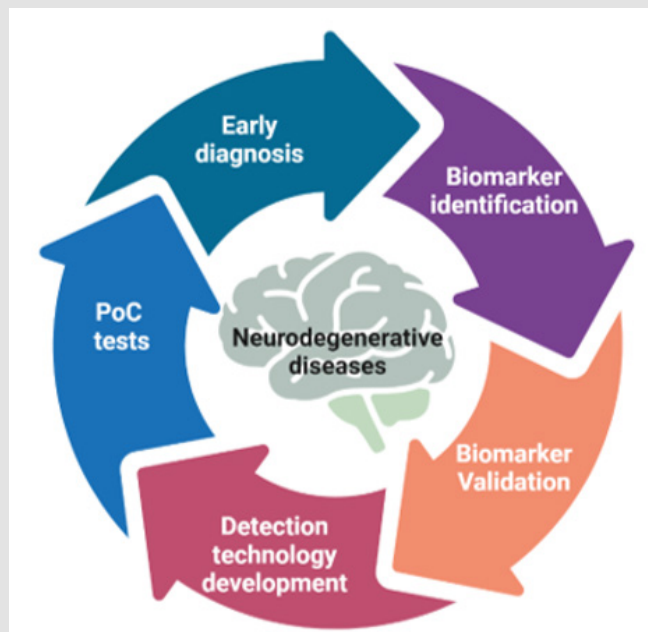
aggregates of  $\alpha$ -synuclein), Lewy body dementia and Huntington's disease [2]. Gradual neuronal degeneration leads to a loss of functionality and personal independence, making caregivers and medical attention necessary. The impact of NDs is substantial, with global healthcare costs exceeding hundreds of billions of dollars annually, according to the World Health Organization (WHO) [3]. Expenses include social and healthcare costs, as well as the loss income for affected individuals and their caregivers [4,5]. Due to their high social and economic impact, the WHO has declared dementia, predominantly caused by Alzheimer's, [6] as a priority disease in the Mental Health Action Programme, and the European Parliament has



also emphasized the fight against Alzheimer diseases (AD) through the Declaration on priorities in the fight against Alzheimer's disease (2010/C 76 E/17) [7].

The prognosis for NDs is complex due to factors such as age, family history, and genetic or environmental influences. Diagnosis typically involves a comprehensive clinical examination, medical history assessment, neuroimaging (MRI, PET scans), genetic analysis for ND-related mutations, and cerebrospinal fluid (CSF) tests [7] which require lumbar puncture. However, early diagnosis is challenging as initial clinical symptoms often manifest 10-15 years after the onset of anatomophysiological changes [8,9]. Currently no single test can accurately identify most of these neurodegenerative diseases. Moreover, postmortem examination by immunohistochemistry is

often necessary for their correct diagnosis [10]. Early diagnosis is critical to slow their progression. It was demonstrated that several pathologies, such as cardiovascular diseases, cancer or NDs, exhibit altered levels of miRNAs, which can remain stable in blood, CSF, urine, or saliva. Thus, these molecules hold promise as potential early biomarkers. Identifying ND-related miRNAs could guide the development of new detection strategies for these small nucleic acids in biological fluids, enabling less invasive and more specific diagnostic methods for NDs. Therefore, the level of specific miRNAs is of great clinical relevance, encouraging the development of new detection strategies for small nucleic acids in biological fluids and favoring their use as early biomarkers by using less invasive and more specific methods for ND diagnosis (see Figure 1).



**Figure 1:** Scheme of the main elements necessary for early neurodegenerative disease diagnosis.

## The miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) are short fragments of noncoding ribonucleic acid (RNA), approximately 18-25 nucleotides in length that play a role in gene expression regulation at the post-transcriptional level. They were first described in the late 20th century during studies on developmental regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. [11] These small RNA molecules are found in multicellular organisms and are involved in regulating physiological events such as cell proliferation, differentiation or apoptosis by inhibiting the translation of target messenger RNA (mRNA) molecules. This regulatory mechanism primarily involves binding to mRNA sequences, hindering the translation mechanism and preventing

protein formation. [12] miRNAs are highly conserved across species and are typically located in intragenic regions of the genome, mostly within introns and less frequently in exons. The main characteristic of miRNAs is that they are derived from endogenous precursors, exhibit phylogenetic conservation and do not encode protein products. miRNAs play crucial roles in embryonic development and tissue differentiation, exerting control at the post-transcriptional level in almost all cell types [13]. This characteristic, along with the discovery of altered miRNA expression profiles in various diseases, has led to their investigation as potential biomarkers. In 2008, it was shown by Mitchell et al. that miRNAs are not limited to the intracellular environment, since they are present in the bloodstream [14]. Later,

their presence in other body fluids, such as saliva, tears, urine, serum and cerebrospinal fluid (CSF), was also reported. These circulating miRNAs are protected from degradation by ribonucleases in the extracellular environment through their binding to lipoprotein or their incorporation into vesicles, rendering them highly stable under adverse conditions [14]. However, isolation procedures are usually necessary prior to their identification and study.

### Circulating miRNAs as Disease Biomarkers

In recent years, alterations in miRNA patterns at the cellular/tissue level, specifically associated with pathological processes such as inflammation or neurological disorders, have been reported [15]. These unique expression profiles do not depend on race, age or sex, making miRNAs excellent candidates as diagnostic biomarkers [15,16]. Due to their stability in body fluids and the specific expression profiles that can reflect the status of specific organs or conditions, circulating miRNAs have been studied as ND biomarkers. For example, a study by Khoo SK et al. in 2009 demonstrated the efficacy of circulating miRNAs as biomarkers for Parkinson's disease (PD) [15]. The study recruited patients diagnosed with idiopathic PD from a Health Care Parkinson's Center, as well as healthy individuals. Peripheral blood samples were collected to isolate total RNA and microRNA. This work identified nine predictive Parkinson classifier pairs and 13 miRNAs with altered expression levels in patients [15] compared to healthy controls. For the predictive Parkinson classifier pair, the interpretation was as follows: pair (miR-1307/miR-632) "If miR-1307 expression is higher than miR-632 expression, the patient is predicted to have PD; otherwise, the patient is predicted to be a healthy control".

### MicroRNA Detection Procedure

The detection of miRNAs as biomarkers in biological fluids requires accurate, sensitive, reproducible and multiplexed methods [17]. In general, the choice of method will depend on the quantity and quality of the biological sample. The detection process comprises three stages: isolation, amplification, and detection. The isolation of miRNA from the biological matrix is crucial. This involves pretreatment of the sample, using chaotropic agents, detergents and/or organic solvents to promote the lysis of lipidic vesicles and lipoproteins [17]. In addition, centrifugation or solid-phase extraction through affinity columns is also necessary to remove particulate components and debris from the sample. Due to their low abundance, miRNA purification could necessitate the use of amplification methods to facilitate their detection. Polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used amplification method to detect and amplify low-abundance nucleic acids. Conventional PCR amplifies a specific segment by repeated thermal cycles of denaturation, annealing and extension. In the case of RNA templates, a reverse transcription step is added to convert RNA to DNA (RT-PCR protocol). In the last

decade, several powerful isothermal amplification strategies have been developed for the sensitive detection of miRNAs. The isothermal amplification technique replicates nucleic acids at a constant temperature, eliminating the need for thermal cyclers and making them more cost-effective and simpler to implement in point-of-care (PoC) tests. These techniques include a variety of methods in which different combinations of enzymes or primer designs are involved in their amplification protocol [18].

However, amplification techniques need to be integrated into detection platforms to enable the correct identification of specific miRNA sequences. Standard methods for miRNA detection are based on gel electrophoresis and molecular hybridization with fluorescence probes [19]. However, from a medical standpoint, the urgent need for current diagnostic devices is not only focused on high sensitivity but also on portable and simple-use devices that can be performed at PoC. Biosensor technology has the potential to speed up detection and to increase specificity and sensitivity. Moreover, they may enable high-throughput analysis and may be used for early diagnosis. Today, they are replacing other more sophisticated techniques, and they will be an important tool in healthcare applications.

### Electrochemical Biosensors for ND Diagnosis

A biosensor is an electronic device used to transform a biological interaction into an electrical signal. This device is based on the direct spatial coupling of the immobilized biologically active element, the so-called "bioreceptor", with a transducer that acts as a detector and electronic amplifier [20]. Electrochemical transduction offers the advantages of high sensitivity, which can be enhanced by attaching biocatalytic labels to bioreceptor-target complexes to amplify the detection signal, is readily miniaturized, and has a low cost of production since it does not require expensive instrumentation for read-out (Figure 2) [21]. Although several alternatives have been proposed and different miRNA detection strategies have been reported, the development of sensor platforms for the diagnosis of neurodegenerative diseases is limited. The initial electrochemical approaches were based on enzyme-linked magneto-immunoassays, as proposed by Erdem et al. in 2013 [22]. They used a screen-printed electrode (SPE) array combined with streptavidin-magnetic particles as a solid support to immobilize biotinylated specific capture probes to miR-15a. For detection, an alkaline phosphatase-streptavidin conjugate was used. Other examples include the multiplexed detection of three different miRNAs (miRNA-15a, miRNA-16, and miRNA-660), all AD related, using voltammetry readout [23]. The same research group has also developed voltammetric and impedimetric sensors for the detection of miRNA-34a, another AD biomarker [24,25]. They modified pencil graphite electrodes with graphene oxide (GOx). While the sensor showed good selectivity for miRNA-34a, the detection limits were moderate. Other electrochemical strategies,

such as electrochemical impedance spectroscopy using molybdenum disulfide nanosheet-modified electrodes, have been developed with

better performance. However, this methodology has been developed for cancer biomarkers [26].

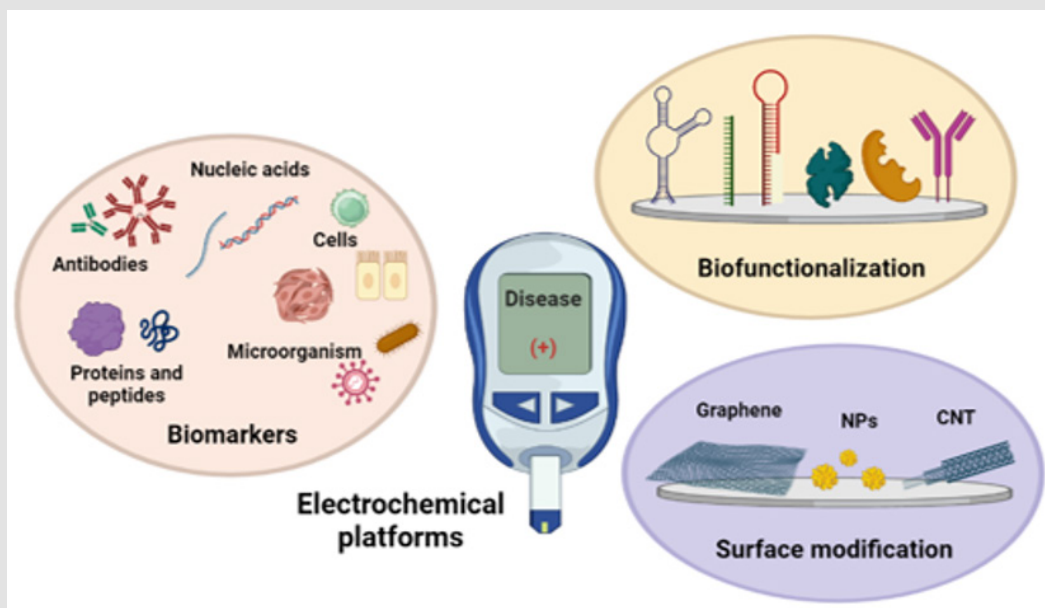


Figure 2: Schematic representation of biosensor components and its applicability.

The incorporation of nanomaterials such as graphene, graphene oxides, and gold nanostructures in the development of diagnostic platforms, especially in the fabrication of electrochemical biosensors, has been shown to be highly attractive for improving the sensitivity of the methods. Liu et al. fabricated triangular electrodes by combining nanomaterials such as GOx and gold nanostars conjugated with capture probes for the detection of miRNA-137 as an Alzheimer's biomarker [27]. The obtained results have demonstrated detection limits on the order of 10 fM. Another approach for the same target was reported by Naderi-Manesh's group. They developed an electrochemical nanobiosensor for ultrasensitive detection of miR-137 using electrodes modified with gold nanowires, electrochemically reduced GOx, and doxorubicin to enhance the sensitivity to the fM range. [28] This system, tested in human serum, has revealed its potential as a diagnostic tool for Alzheimer's disease. Another example is SPE modification with gold nanoparticles and methylene blue-labeled anti-miRNA-29a probes, reported by Miglione et al. [29]. These electrodes were used for square wave voltammetry measurement for miRNA-29a detection, a class of miRNAs known to regulate the pathogenesis of AD. This sensor was evaluated in serum and buffer, showing limited detection limits.

Other sensing designs, in this case for miR-137 and miR-142 detection (AD biomarkers), have reported a fluorescence nanobiosensor coupled with isothermal amplification of miRNAs by

hybridization chain reaction [30]. The levels of these miRNAs were quantified using SYBR green as a fluorescent marker and graphene oxide (GoX) as a fluorescence quencher. Fluorescence intensity was used to quantify the miRNA levels based on the creation of hybridization events when the target miRNA was present in a serum sample. In the same way, a label-free electrochemical nanobiosensor was used for the detection of miR-155, a biomarker for multiple sclerosis. The high sensitivity of the nanobiosensor was also based on electrode modification techniques. In this case, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and polypyrrole nanocomposites were used on a graphite sheet substrate to enhance bioreceptor immobilization performance [31]. To our knowledge, although microfluidic electrochemical platforms ( $\mu$ PADs) or colorimetric paper-based sensors have been developed for miRNA detection, [26-33] none of them have been designed as biomarkers of neurodegenerative diseases.

All the platforms mentioned before could be capable of giving quick answers to patients, reducing the time gap between diagnosis/treatment and disease onset. Currently, the main limitation is the lack of validation with real samples since most of them were tested in buffer of artificial spiked samples.

## Conclusion

Currently, there is an urgent demand for new diagnostic tools for point-of-care applications. Moreover, the early detection of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, among others, may reduce the devastating effects on families and patients, including increasing their quality of life and extending their life expectancy. Such diseases are often detected in the last stages, when visual and evident cognitive effects are observed. However, some biochemical changes and protein expression in the patients may be detected approximately 10-15 years before the first symptoms of the disease appear. The development of novel point-of-care tests for early diagnosis needs a multidisciplinary approach where several elements are necessary: biomarkers, sample matrix, readout systems, isolation and amplification strategies, clinical studies, etc. Here, we showed the importance of microRNAs and their potential application in the early diagnosis of certain neurodegenerative diseases. Moreover, the use of electrochemical biosensors and biosensors may be a useful tool due to their advantages (low cost, miniaturization, user-friendly instrumentation). Finally, more relevant studies combining different electrochemical strategies, such as those used on magnetic beads and amplification and labeling techniques, were presented.

## Acknowledgments

This work was funded by Interreg MAC 2014–2020 program (project: MacBioidi 2). Soledad Carinelli gratefully acknowledges the financial support of the “Juan de la Cierva Programme” (FJC2020-043734-I) financed by the “Ministerio de Ciencia e Innovación” and the “Agencia Estatal de Investigación” of the Spanish Government.

## References

1. Sheikh S, E Haque, S S Mir, Safia (2013) Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions. *Journal of neurodegenerative diseases* 2013.
2. Shastry B S (2003) Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry international* 43(1): 1-7.
3. Sloane P D, Sheryl Zimmerman, Chirayath Suchindran, Peter Reed, Lily Wang, et al. (2002) The public health impact of Alzheimer's disease, 2000–2050: potential implication of treatment advances. *Annual review of public health* 23(1): 213-231.
4. Cupers P, J Sautter, A Vanvossel (2006) European Union research policy and funding for Alzheimer disease. *Nature Medicine* 12(7): 774-775.
5. Lopez Bastida J, Pedro Serrano Aguilar, Lilisbeth Perestelo Perez, Juan Oliva Moreno (2006) Social-economic costs and quality of life of Alzheimer disease in the Canary Islands, Spain. *Neurology* 67(12): 2186-2191.
6. Rosow K, Andrew Holzapfel, Jason H Karlawish, Matthew Baumgart, Lisa J Bain et al., (2011) Countrywide strategic plans on Alzheimer's disease: developing the framework for the international battle against Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 7(6): 615-621.
7. Winblad B, Philippe Amouyel, Sandrine Andrieu, Clive Ballard, Carol Brayne, et al. (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology* 15(5): 455-532.
8. Sutphen C L, Mateusz S Jasielc, Aarti R Shah, Elizabeth M Macy, Chengjie Xiong, et al. (2015) Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker changes in preclinical Alzheimer disease during middle age. *JAMA neurology* 72(9): 1029-1042.
9. Twamley E W, S A L Ropacki, M W Bondi (2006) Neuropsychological and neuroimaging changes in preclinical Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society* 12(5): 707-735.
10. Bédier A, Pierre Joris, Sébastien Mosser, Patrick C Fraering, Philippe Renaud et al., (2015) Detection of Alzheimer's disease amyloid-beta plaque deposition by deep brain impedance profiling. *Journal of neural engineering* 12(2): 024001.
11. Bhaskaran M, M Mohan (2014) MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology* 51(4): 759-774.
12. Wienholds E, R H Plasterk (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS letters* 579(26): 5911-5922.
13. Amaral P, J S Mattick (2008) Noncoding RNA in development. *Mammalian genome* 19: 454-492.
14. Mitchell P S, Chael K Parkin, Evan M Kroh, Brian R Fritz, Stacia K Wyman, et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30): 10513-10518.
15. Khoo S K, David Petillo, Un Jung Kang, James H Resau, Brian Berryhill, et al. (2012) Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease* 2(4): 321-331.
16. Connell R M, Konstantin D Taganov, Mark P Boldin, Genhong Cheng, David Baltimore, et al. (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(5): 1604-1609.
17. Salim H, Roger Pero Gascon, Laura Pont, Estela Giménez, Fernando Benavente, et al. (2022) A review of sample preparation for purification of microRNAs and analysis by mass spectrometry methods. *Microchemical Journal*, pp. 107849.
18. Zhao Y, Ra Feng Chen, Qian Li, Lihua Wang, Chunhai Fan, et al. (2015) Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical reviews* 115(22): 12491-12545.
19. Kilic T, Arzum Erdem, Mehmet Ozsoz, Sandro Carrara (2018) microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. *Biosensors and Bioelectronics* 99: 525-546.
20. Thévenot D R (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters* 34(5): 635-659.
21. Ronkainen N J, H B Halsall, W R Heineman (2010) Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews* 39(5): 1747-1763.
22. Erdem A, G Congur, E Eksin (2013) Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of MicroRNAs. *Sensors and Actuators B: Chemical* 188: 1089-1095.
23. Erdem, A G Congur (2014) Label-free voltammetric detection of MicroRNAs at multi-channel screen printed array of electrodes comparison to graphite sensors. *Talanta* 118: 7-13.
24. Congur G, E Eksin, A Erdem (2018) Impedimetric detection of miRNA-34a

- using graphene oxide modified chemically activated graphite electrodes. *Sensors and Actuators A: Physical* 279: 493-500.
25. Isin D, E Eksin, A Erdem (2017) Graphene oxide modified single-use electrodes and their application for voltammetric miRNA analysis. *Materials Science and Engineering: C* 75: 1242-1249.
  26. Yarali E, Ugur Tamer, Abhijit Ganguly, Pagona Papakonstantinou, Hilal Torul, et al. (2022) Impedimetric detection of miRNA biomarkers using paper-based electrodes modified with bulk crystals or nanosheets of molybdenum disulfide. *Talanta* 241: 123233.
  27. Chang W, Jing Zhao, Yonggang Liu, et al. (2021) Graphene oxide-gold star construct on triangular electrodes for Alzheimer's disease identification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2021.
  28. Azimzadeh M. et al. (2017) Early detection of Alzheimer's disease using a biosensor based on electrochemically-reduced graphene oxide and gold nanowires for the quantification of serum microRNA-137. *RSC advances* 7(88): 55709-55719.
  29. Miglione A, Ada Raucci, Jussara Amato, Simona Marzano, Bruno Pagano, et al. (2022) Printed Electrochemical Strip for the Detection of miRNA-29a: A Possible Biomarker Related to Alzheimer's Disease. *Analytical Chemistry* 94(45): 15558-15563.
  30. Rahaie M, S K Noroozi (2019) A nanobiosensor based on graphene oxide and DNA binding dye for multi-microRNAs detection. *Bioscience Reports*, 39(12).
  31. Shariati S, A Ghaffarinejad, E Omidinia (2022) Early detection of multiple sclerosis (MS) as a neurodegenerative disease using electrochemical nano-apta-sensor. *Microchemical Journal* 178: 107358.
  32. Yao M, Xuefei Lv, Yulin Deng, Madiha Rasheed (2019) Specific and simultaneous detection of micro RNA 21 and let-7a by rolling circle amplification combined with lateral flow strip. *Analytica chimica acta* 1055: 115-125.
  33. Wang W, Yun Li, Axiu Nie, Gao Chao Fan, Heyou Han, et al. (2021) A portable SERS reader coupled with catalytic hairpin assembly for sensitive microRNA-21 lateral flow sensing. *Analyst* 146(3): 848-854.

ISSN: 2574-1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2023.50.008003

Pedro A Salazar-Carballo. Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>



#### Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<https://biomedres.us/>