

Trabajo de Fin de Grado



Grado en Farmacia

Curso 2023/24

DESARROLLO DE GENOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE CÁNCER EN EL PUNTO DE ATENCIÓN

Sergio Álvarez Jurado

(alu0100723175@ull.edu.es)

Tutor: Dr. Ilaria Gamba

Índice

Índice	2
Datos referidos a la memoria:.....	4
Resumen	5
Abstract	5
Introducción	6
1.1 Biomarcadores para la detección temprana de cáncer.....	6
1.1.1 Detección de ctDNA.....	7
1.2 Importancia de la biopsia líquida.	7
Objetivos.....	9
Material y métodos.....	10
Resultados	11
2. Biosensores.	11
2.1 Biosensores electroquímicos.....	12
2.2 Biosensores pizoeléctricos.	12
2.3 Biosensores ópticos.	13
3. Genosensores.....	14
3.1 Genosensor para la detección de la metilación del gen MGMT en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello.....	14
3.2 Genosensor desarrollado para la detección de cáncer de cuello uterino. ..	17
3.3 Plataforma de detección de bioparcadores duales para cuantificar ctDNA. 18	

Discusión	20
Conclusiones	21
Bibliografía	22



Datos referidos a la memoria:

Número de páginas de la memoria	23
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	3273
Número de palabras del resumen	149
Número de palabras del abstract	136

Resumen

La capacidad de detección del cáncer en sus estadios más tempranos supone un aumento en las tasas de supervivencia de los pacientes. La presente revisión bibliográfica tiene como objetivo principal analizar las características de los genosensores y sus aplicaciones para la detección precoz del cáncer, ya que estos dispositivos exceden muchas de las dificultades con las que cuentan los métodos actuales de diagnóstico de la enfermedad. A partir de la información contenida en una serie de artículos científicos se define el concepto de genosensor dentro del conjunto formado por los biosensores, que serán aquellos dispositivos capaces de reconocer distintos componentes de origen biológico en muestras complejas. Se analiza el funcionamiento de distintos dispositivos desarrollados hasta la fecha, los métodos de validación que determinan la selectividad y la eficiencia del proceso, así como los desafíos y oportunidades de futuro de esta nueva tecnología utilizada en la detección temprana del cáncer.

Abstract

The ability to detect cancer in its early-stage will increase the survival rate of patients. The main objective of the present literature review is to analyse the specific characteristics of genosensors, as they can be promising platforms for the development of devices for the premature diagnosis of cancer. These devices solve detection problems found in other types of cancer detection methods. Based on a collection of scientific articles, this review highlights the concept of genosensor within the biosensor technology. Biosensors are analytical devices used for the detection of different components in complex biological samples. In particular, the present review summarizes the characteristics of different devices developed to date, the validation methods that determine the selectivity and efficiency of the process; and explains the challenges and opportunities of this new technology in the early-stage detection of cancer.

Introducción

La carcinogénesis es el proceso de desarrollo del cáncer y es debida a diversas modificaciones genéticas y/o epigenéticas. Las genéticas implican un cambio en la secuencia primaria, ya sea por eliminación, inserción, translocación o mutación de alguna base, mientras que las epigenéticas implican una modificación covalente en el ADN que se traduce en cambios en la función o expresión de los genes, cambia el fenotipo sin que el genotipo se vea alterado.[1]

Las tecnologías que permitan detectar estas modificaciones tienen una importancia fundamental para lograr su detección en su estadio inicial. Actualmente ante una sospecha de cáncer se realiza una biopsia del tejido que permite saber el tipo y subtipo de cáncer. Además, se realizan pruebas de imagen como mamografías, resonancias magnéticas, tomografías, etc, que permiten conocer el estadio y la progresión del tumor. Sin embargo, estas pruebas acarrearán una serie de desventajas. Las pruebas de imagen presentan una sensibilidad limitada, están ligadas a dosis altas de radiación y precisan de instrumental pesado que limita su uso a Hospitales. La biopsia por su parte suele generar dolor y cuenta con poca aceptación por parte del paciente, además de requerir personal especializado para su ejecución y posterior análisis.

Dentro de este marco teórico destaca la importancia de desarrollar protocolos diagnósticos en el punto de atención primaria que acometan estas desventajas y proporcionen mayor sensibilidad, especificidad y precisión para la detección del cáncer, los cuales se puedan aplicar en entornos con recursos limitados como podría ser un entorno rural o países en vías de desarrollo. [2]

1.1 Biomarcadores para la detección temprana de cáncer.

Los biomarcadores son elementos característicos de procesos fisiológicos que, proporcionan por medio de evaluaciones y medidas adecuadas, información objetiva sobre el estado de dichos procesos. Podemos encontrar biomarcadores de detección, diagnóstico, predicción y pronóstico.

Los elementos que sirven de biomarcadores en el cáncer serán células tumorales, proteínas, metabolitos o ácidos nucleicos que se liberan durante la carcinogénesis. Además, también podemos detectar mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores.

Los biomarcadores han de cumplir una serie de condiciones para considerar su uso a la hora de desarrollar sensores para la detección del cáncer. Han de ser fáciles de recolectar, eliminando así el problema de las pruebas invasivas. Deben presentar una especificidad suficiente que nos permita discernir entre estados normales y estados patológicos. Deben ser estables, proporcionar un tiempo razonable para realizar la prueba de detección. Debe ser adecuado para la reproducibilidad y automatización del proceso de detección. [2]

1.1.1 Detección de ctDNA.

El ADN tumoral circulante (ctDNA) es un tipo de ADN que liberan las células cancerígenas cuando se produce apoptosis. Es usado como biomarcador en las técnicas de biopsia líquida. Tiene un tiempo de vida corto, lo que nos permite conocer en tiempo real el estado de la enfermedad.

En un estudio, Newman y colaboradores usaron la técnica de secuenciación profunda de exoma completo y perfiles personalizados (CAPP-Seq) para la detección de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). [3] En dicho estudio los autores detectaron ctDNA en el 100% de los pacientes que tenían NSCLC en estadio II-IV. Mientras que en los pacientes que presentaban estadio I se detectó ctDNA en el 95%. [1]

1.2 Importancia de la biopsia líquida.

La biopsia líquida presenta un gran potencial para convertirse en el sustituto de la biopsia sólida, “ha sido establecida como una de las 10 principales tecnologías emergentes del 2017 por el Foro Económico Mundial porque puede marcar un paso adelante en la lucha contra el cáncer”. [4] Como ya hemos comentado, la biopsia sólida presenta las desventajas de que es dolorosa, en ocasiones peligrosa e incluso a veces no se puede realizar.

En la biopsia líquida recogemos los fluidos corporales en los que encontraremos los biomarcadores de forma menos invasiva. Además, permite analizar varios biomarcadores en una sola muestra, arrojando una visión de conjunto sobre el perfil molecular del tumor.

La biopsia líquida es una técnica sensible, específica y precisa que permite hacer una detección más compleja que la biopsia sólida, ya que tiene en cuenta la

heterogeneidad del tumor y además ofrece la ventaja de poder hacer un seguimiento de su estado en tiempo real tan solo con una pequeña muestra de sangre. [1]



Objetivos

Los objetivos de la presente revisión bibliográfica son:

- Exponer las desventajas con las que cuentan los métodos actuales de detección del cáncer, así como la necesidad de encontrar nuevas técnicas que permitan realizar un diagnóstico precoz.
- Analizar el uso de biosensores en la detección de esta enfermedad.
- Analizar el funcionamiento de los genosensores y los métodos de validación utilizados para determinar que el proceso de detección del cáncer se ha llevado a cabo con éxito.
- Identificar los aspectos que se podrían mejorar durante el desarrollo de esta tecnología.
- Exponer las perspectivas de futuro en este campo de investigación.

Material y métodos

Para la presente revisión bibliográfica se ha hecho acopio de información sobre distintas investigaciones relacionadas con el campo de los genosensores disponibles en varias fuentes de información.

Para realizar la búsqueda primeramente se ha usado el Google scholar, el cual permite encontrar bases de datos como Sciencedirect, Hindawi, ACS y Nanotheranostics en las que se encuentran multitud de revistas científicas con información contrastada para la estructuración y desarrollo del trabajo.

Las palabras clave a la hora de buscar los primeros artículos fueron “genosensor”, “genosensor diagnóstico cáncer”. Una vez encontrados los primeros artículos relacionados se pudo afinar más la búsqueda hacia conceptos más complejos como “etiquetas genosensores”, “biopsia líquida cáncer”, y así la información se fue completando hasta entender el tema con profundidad.

Para la bibliografía se empleó el formato Vancouver, el cual incluye los enlaces que permiten el acceso rápido y directo a los artículos citados en esta revisión.

Resultados

2. Biosensores.



Facultad de Farmacia

Universidad de La Laguna

Según la definición de la IUPAC de 1999 un biosensor es un “dispositivo transductor receptor integrado de forma independiente, que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa selectiva utilizando un elemento de reconocimiento biológico”. En otras palabras, un dispositivo capaz de reconocer un bioindicador específico y producir una señal que nos permita cuantificar la presencia de dicho bioindicador en una muestra biológica.

Los biosensores están constituidos por un elemento biológico que actúa como receptor, este receptor está fijado sobre una superficie, al agregar la muestra biológica a la superficie el receptor interacciona con su diana, que en este caso sería el bioindicador. Esto produce una señal que posteriormente se amplifica para facilitar su detección. [1]

Los esfuerzos de la investigación en este campo se centran en lograr dispositivos miniaturizados que sean rápidos a la hora de arrojar resultados, que utilicen pequeños volúmenes de muestra y que además sean baratos.

Los autores Dara y colaboradores desarrollaron una clasificación de los biosensores atendiendo a varios criterios que se muestra en la Figura 1: (A) Según la muestra biológica que se utilice. (B) Según el tipo de receptor de bioreconocimiento que se utilice y el elemento de amplificación de señal (etiqueta) que lleve incorporado. (C) Según el tipo de transducción de señal (electroquímicos, pizoeléctricos y ópticos). [2]

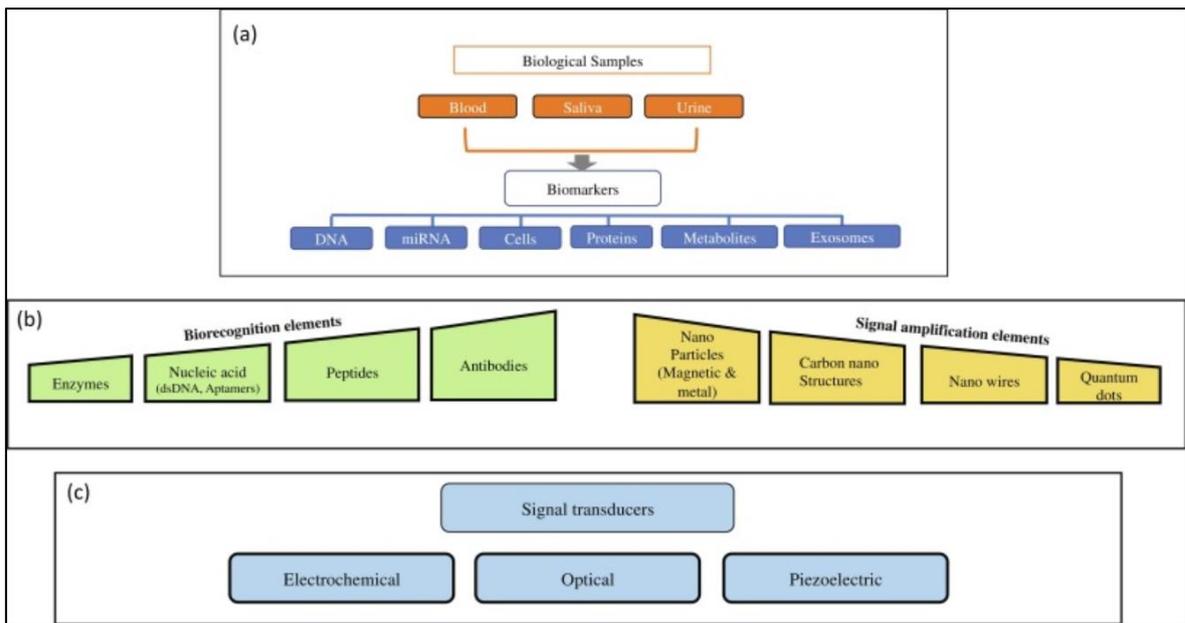


Figura 1: Clasificación de biosensores según los criterios (A) Muestra que se analiza. (B) Elemento de biorreconocimiento y etiqueta utilizados. (C) Tipo de señal generada. (Imagen reproducida con permiso de Dara et al. 2022). [2]

2.1 Biosensores electroquímicos.

En los biosensores electroquímicos el receptor está fijado a la superficie. Una vez entra en contacto con la muestra biológica e interacciona con el bioindicador se produce una reacción oxidación/reducción que genera la señal. La señal eléctrica es directamente proporcional a la concentración de bioindicador en la muestra.

La señal en los biosensores electroquímicos pueden ser cambios de corriente (biosensor electroquímico amperométrico), el potencial (biosensor electroquímico potenciométrico), la conductancia (biosensor electroquímico conductimétrico) o la impedancia (biosensor electroquímico impedimétrico) (Figura 2A).

2.2 Biosensores pizoeléctricos.

Los biosensores pizoeléctricos detectan el cambio en la vibración de un cristal de cuarzo cuando se produce un cambio de masa, el cual es debido a la unión del bioindicador al receptor. El cristal de cuarzo cumple la función de balanza, el cambio de masa produce una señal eléctrica directamente proporcional a la variación positiva de masa producida una vez el bioindicador se ha unido al receptor (Figura 2B).

2.3 Biosensores ópticos.

El principio de detección en este tipo de biosensores es el cambio en la absorción o emisión de luz (UV/visible/infrarroja) observado una vez el bioindicador se ha unido al receptor.

En los biosensores ópticos el receptor está fijado a una superficie sensora y la muestra con el bioindicador fluye a través de esa superficie. Posteriormente, se analiza el cambio de emisión o absorción de luz producido sobre la superficie con un detector óptico (Figura 2C).

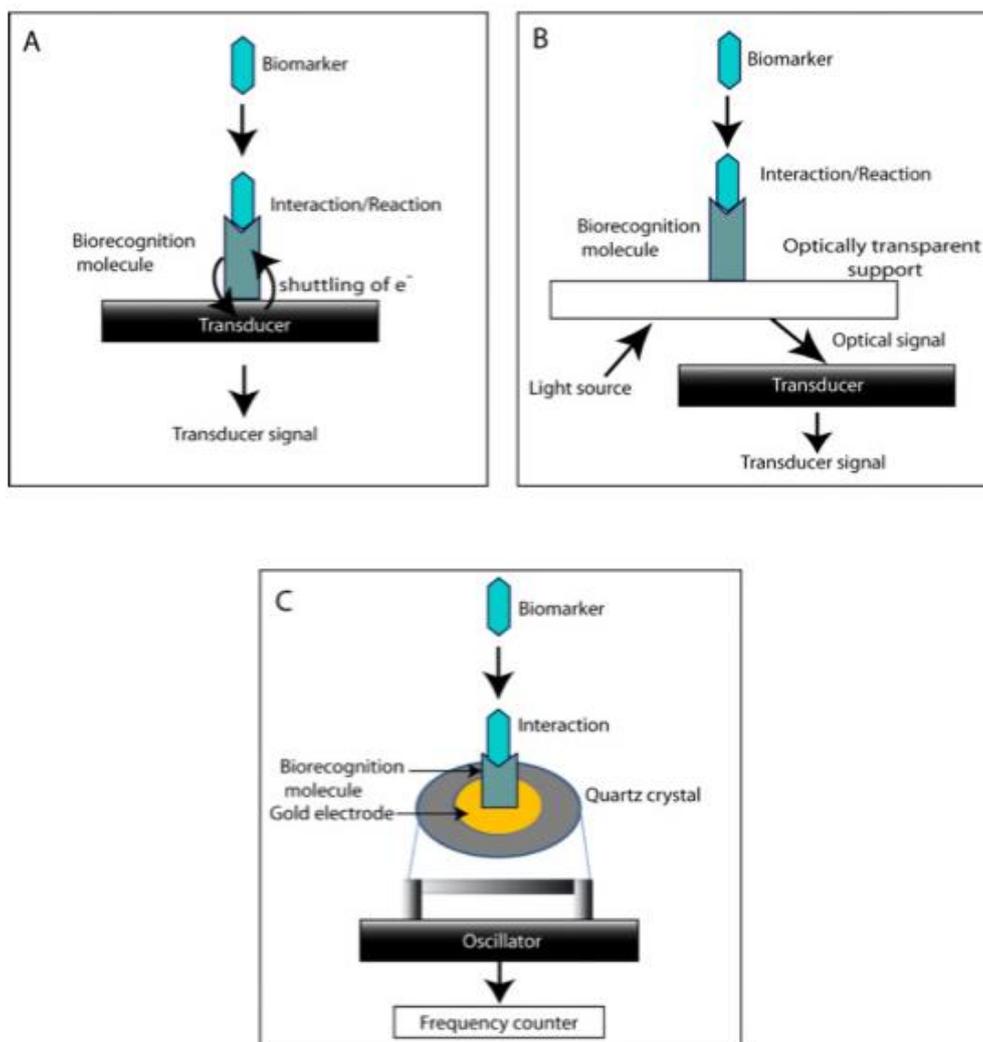


Figura 2: Esquema que representa (A) biosensores electroquímicos, (B) biosensores ópticos y (C) biosensores pizoeléctricos. (Imagen reproducida con el permiso de Dara et al. 2022). [2]

3. Genosensores.

Los genosensores son un tipo de biosensores que utilizan sondas de ADN fijadas a una superficie como elemento de reconocimiento. La estrategia de detección en el caso de genosensores se basa en la interacción entre la doble hebra del ADN y analitos específicos (agentes intercalantes u otras moléculas que pueden interacción con la hebra del ADN). Esta interacción daría lugar a una respuesta electroquímica que se amplifica y se aprovecha para señalar el reconocimiento del sensor.

Para el desarrollo de este tipo de dispositivos se emplea la técnica de formación de nanoestructuras autoensambladas (SAM). Con esta técnica podemos conseguir una nanoestructuración de monocapas (SAM) de alquiltioles sobre la superficie del genosensor que garantiza la reproducibilidad del método debido a que permite controlar la orientación y distribución de las secuencias de ADN, logrando un espesor definido y una estructura tridimensional. [5]

Según la investigación de García-Melo y colaboradores, [5] para que el proceso de detección se lleve a cabo con éxito es necesario un grado de ordenación de las sondas de ADN que están inmovilizadas sobre la superficie del genosensor. Aquí juega un papel clave la matriz donde se fijan las sondas. La matriz estará constituida por nanomateriales que permiten fijar las sondas de ADN y además actúan amplificando la señal al ser elementos conductores, lo que se traduce en una mayor sensibilidad del dispositivo.

Estos nanomateriales que confieren una mayor sensibilidad al sensor se denominan etiquetas, las etiquetas usadas en el desarrollo de genosensores electroquímicos son nanotubos de carbono, grafeno y sus derivados, estructuras organometálicas, nanopartículas metálicas y puntos cuánticos. Al ser conductores amplifican la señal, lo que se traduce en poder detectar la hibridación del ADN a concentraciones muy bajas. [6]

3.1 Genosensor para la detección de la metilación del gen MGMT en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello.

Los investigadores Carr y colaboradores desarrollaron un genosensor electroquímico capaz de detectar la metilación en la región promotora del gen MGMT. [7] Se trata de

una alteración epigenética que conduce a la inactivación de un gen supresor de tumores y condiciona a la aparición de cáncer de cabeza y cuello. Según este estudio “el 5% de las regiones promotoras de estos genes se encuentran metiladas en los tumores sólidos”.

En este estudio se desarrollaron dos dispositivos, se emplearon electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de ácido mercaptúrico (MAA) y ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) para fijar las sondas de ADN (Figura 3).

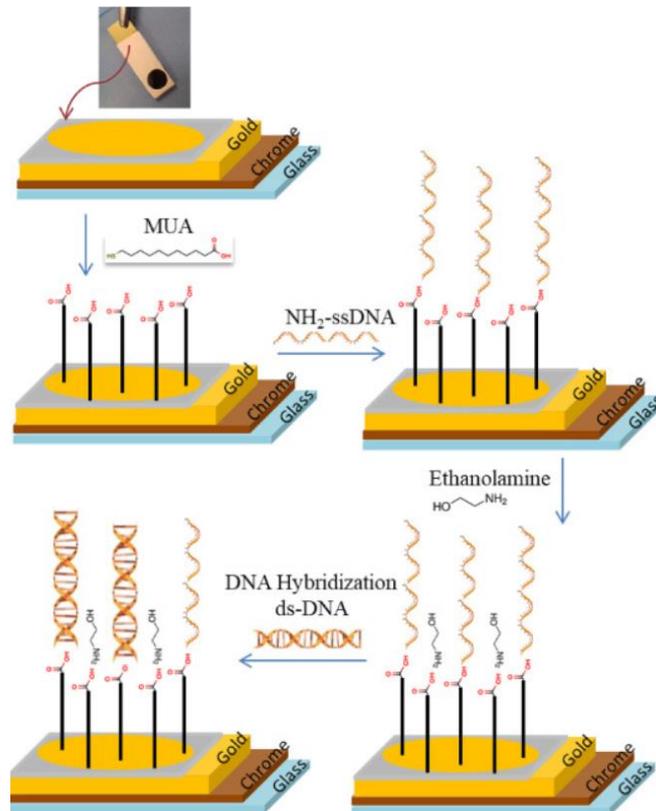


Figura 3: Esquema de fabricación y funcionamiento del genosensor con capa SAM de MUA. (Imagen reproducida con el permiso de Carr et al. 2020). [7]

Ambos genosensores fueron expuestos a muestras con distintas concentraciones de ADN complementario (A), y ADN no complementario (B). En caso (A) se muestra cómo la impedancia electroquímica aumenta a medida que aumenta la concentración de ADN, resultado de la hibridación entre las dos hebras que al formar una doble hélice a través de los grupos fosfato electronegativos impiden que la especie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ alcance el electrodo debido a la repulsión electrostática. En el caso (B) apenas se observa cambio

en la impedancia debido a que son cadenas no complementarias, los pequeños cambios observables son debido a interacciones no específicas (Figura 4).

Para demostrar la selectividad del método los autores utilizaron diferentes secuencias de ADN. [7] La primera secuencia era complementaria (ds-DNA), la segunda contenía un cambio de una sola base (1b-DNA) y la tercera era de un ADN no complementario (nc-DNA). Los resultados demostraron que el genosensor era selectivo debido a que el mayor aumento de impedancia se observó con la muestra de ADN complementario, seguido por la muestra que contenía ADN que difería en una base respecto a la secuencia complementaria(1b-DNA), en este caso se observó un aumento de la impedancia claramente menor. Finalmente el menor aumento de la impedancia se observó en el caso del DNA no complementario.

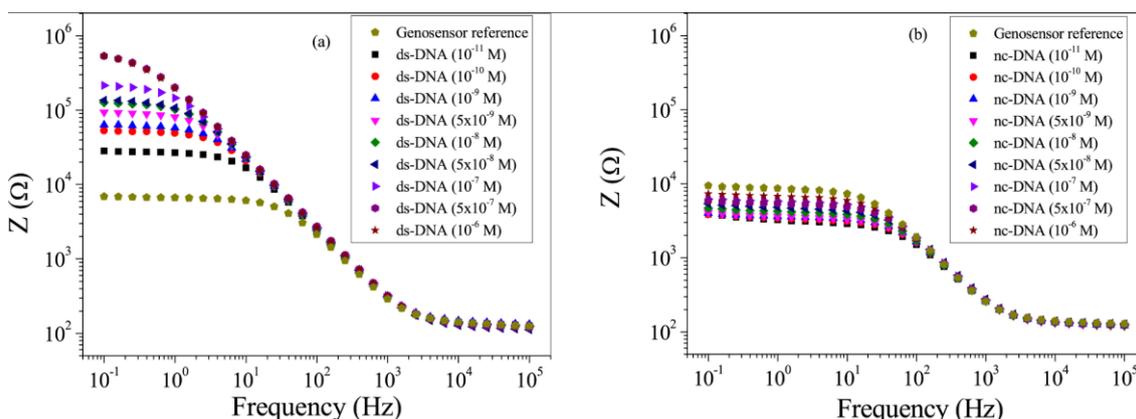


Figura 4: Espectros de impedancia electromagnética donde se observa la variación de impedancia al aumentar la concentración de ADN complementario (A) y ADN no complementario (B). (Imagen reproducida con el permiso de Carr et al. 2020). [7]

Para validar el rendimiento, se seleccionaron las diferentes líneas celulares de cabeza y cuello que presentaban mayor porcentaje de metilación en sus regiones promotoras. El ADN de estas líneas celulares se trató con bisulfito sódico, lo que produjo que las citocinas no metiladas pasaran a uracilo y posteriormente a timinas, respetando la integridad del resto de bases de la secuencia de ADN. Se observó que las muestras de ADN con mayor porcentaje de citocinas metiladas fueron las que presentaron un mayor aumento de la impedancia (una concentración de $10^{-6} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ de sonda complementaria presentó un aumento de la impedancia de 190 kΩ), ya que fueron las que menos alteración sufrieron al someterse al tratamiento con bisulfito sódico, mientras que las muestras que menor porcentaje de metilación presentaban fueron las más transformadas con dicho tratamiento y por tanto, no complementarias,

presentando un aumento de la impedancia menor (una concentración de $10^{-6} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ de sonda no complementaria presentó un aumento de la impedancia de 10 k Ω).

El genosensor con SAM de MAA no detectó la secuencia complementaria de DNA. Tras realizar una espectroscopía SFG se determinó que era debido a que la capa SAM de MAA no presentaba un grado de ordenación suficiente. Por otro lado, el genosensor con SAM de MUA si pudo detectar las sondas de ADN con un límite de detección de $2,4 \times 10^{-13} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, lo que según los investigadores confirma que el método es apto para la detección del cáncer en sus estadios más prematuros.

3.2 Genosensor desarrollado para la detección de cáncer de cuello uterino.

En un estudio de Rawar y colaboradores se determinó la presencia del virus del papiloma humano (VPH-16) como bioindicador, el cual está estrechamente relacionado con el cáncer de cuello uterino y se presenta en el 70% de los individuos con esta patología. [8]

En este caso los investigadores usaron como soporte una lámina de oro a la que le añadieron láminas de óxido de grafeno reducido (rGO) que permitían aumentar la superficie de fijación, posteriormente, sobre ellas depositaron núcleos de cobre recubiertos con ácido perileno tetracarboxílico (PTCA) el cual gracias a sus grupos carboxilo fijaba las sondas de ADN al mismo tiempo que su núcleo de cobre producía un aumento en la transmisión de la señal. El receptor del genosensor estaría formado por la sonda complementaria de ADN capaz de detectar y determinar la presencia de VPH-16 (Figura 5).

Al realizar una voltamperometría se observó que cuando el genosensor era expuesto a una muestra biológica VPH-16 positiva las corrientes anódicas máximas (I_{pa}) disminuían. La I_{pa} registrada en presencia de VIH-16 fue de 2,5 μA , mientras que en ausencia del virus el valor de I_{pa} era de 6,3 μA . Según los autores de este trabajo, ésto se explica debido a que al producirse la hibridación de la doble hélice de ADN el flujo de electrones se ve dificultado, siendo la variación de la corriente anódica máxima la señal que permitió determinar la presencia del virus en la muestra.

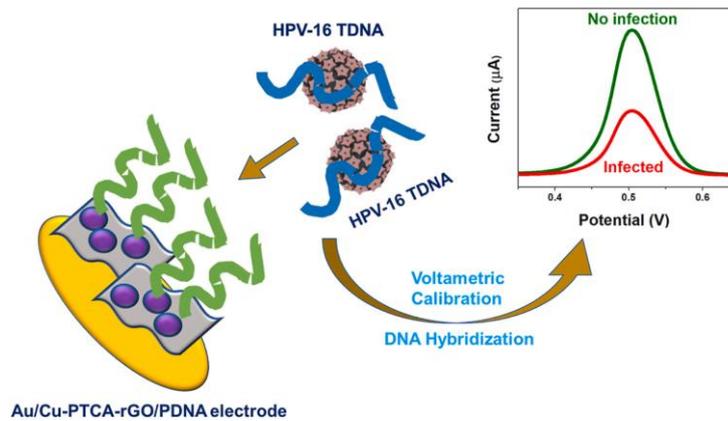


Figura 5: Estructura del genosensor y variación de la corriente anódica máxima en caso de infección y de no infección. (Imagen reproducida con el permiso de Rawat et al.2023). [8]

Para validar el método se expuso el genosensor a una muestra biológica que contuviera VPH-16 y se midió la intensidad de la señal (2,6 µA). Luego a la muestra biológica que contenía el ADN del virus se le añadió una secuencia de ADN no complementaria (nc-ADN) y se volvió a medir la señal (2,57 µA). La variación entre ambas señales fue despreciable (0,03 µA), lo que para los investigadores supuso el desarrollo con éxito de un genosensor selectivo con un límite de detección de $2,15 \times 10^{-15} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$.

3.3 Plataforma de detección de bioparcadores duales para cuantificar ctDNA.

Otro ejemplo de genosensor desarrollado con éxito es el genosensor dual que detecta las mutaciones genotípicas al mismo tiempo que detecta mutaciones fenotípicas como un aumento en el grado de metilación del ctDNA del gen PIK3CA que determina el desarrollo de diversos tipos de cánceres como el de estómago, pulmón, hígado, colon y cerebro. [9]

La novedad de este sensor es el uso de ácido nucleico peptídico (PNA) como receptor. Se trata de un análogo de ADN sintetizado artificialmente que tiene una estructura peptídica descargada, lo que permite que el híbrido formado con su ADN complementario sea más estable, ya que no tiene las cargas negativas de los fosfatos a lo largo de la doble hélice.

Este estudio incorpora la idea de usar una doble etiqueta, es decir, una etiqueta que se unirá a dos puntos de la doble hélice formando una estructura tipo sándwich, lo cual aumentaría aún mas la señal obteniendo un genosensor ultrasensible. Los investigadores optaron por la apoferrina de fosfato de plomo (LPA) conjugada con un

anticuerpo monoclonal 5-metilcitosina (anti-5-mC) capaz de reconocer las distintas mutaciones.

Por tanto, el procedimiento trata de exponer el genosensor a la muestra biológica donde se encuentra el ADN diana. Cuando se forma el híbrido entre el PNA-DNA el anti-5-mC reconocería las regiones donde se encuentran las alteraciones características, tanto mutaciones genéticas como epigenéticas y se uniría a ellas, al hacerlo produce la activación de la apoferrina que actuaría como amplificador de señal.

El límite de detección del genosensor fue de $1 \times 10^{-15} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, siendo la concentración de DNA en sueros de pacientes con cáncer alrededor de $2 \times 10^{-13} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$. También se expuso el genosensor a sueros enriquecidos con ADN no complementario para comprobar la selectividad del dispositivo arrojando lecturas similares a las anteriores, lo que confirma la capacidad del genosensor de discernir entre distintas secuencias de ADN. Según concluyen Cai y colaboradores en su trabajo “Entre las diversas tecnologías desarrolladas para analizar ctDNA hasta la fecha, esta es la primera estrategia que combina un biomarcador dual y un biosensor electroquímico para la detección cuantitativa de ctDNA” (Figura 6). [9]

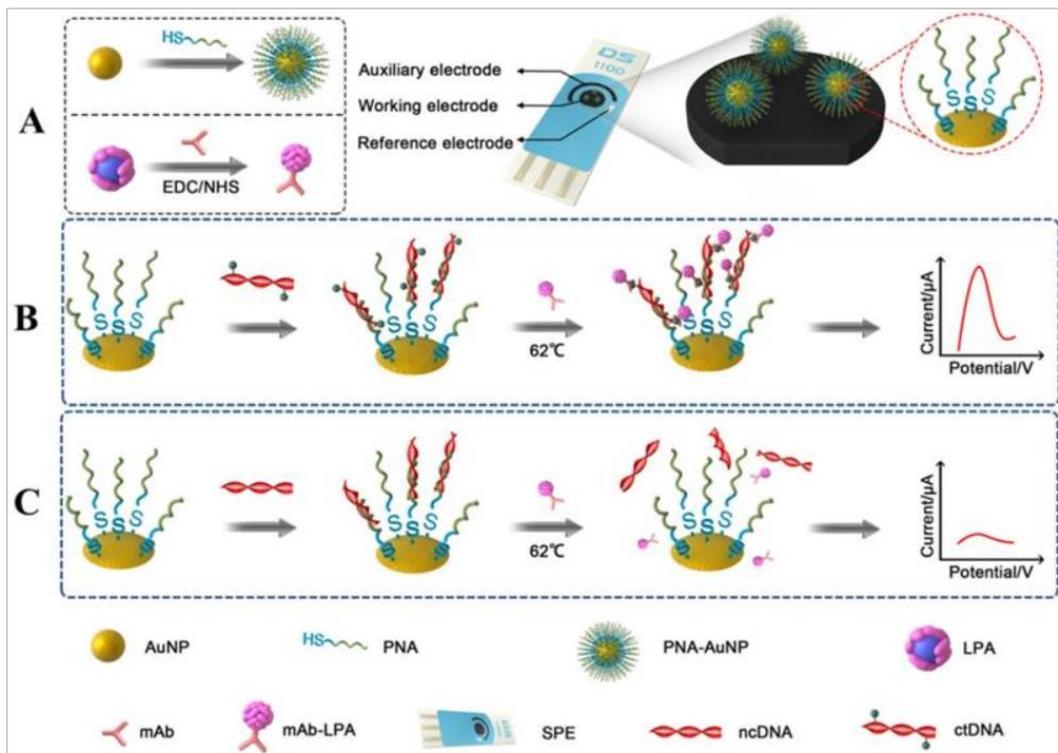


Figura 6: Esquema del proceso de fabricación (A), exposición del genosensor a una muestra de ADN complementario (B) y no complementario (C). (Imagen reproducida con el permiso de Cai et al. 2018). [9]

Discusión

Aunque los genosensores representan un avance en la detección del cáncer en sus etapas más tempranas, aún presentan una serie de problemas que dificultan su comercialización y puesta en marcha.

La necesidad de una capa SAM ordenada supone la diferencia entre el éxito y el fracaso del método. La falta de un protocolo normalizado para la fabricación de estos dispositivos arroja resultados dispares entre estudios que utilizan los mismos componentes. Es por ejemplo el caso del genosensor con capa SAM de MAA que fue incapaz de detectar la metilación de la región promotora del gen, [8] mientras que en otro estudio otros investigadores desarrollaron con éxito un genosensor con capa SAM de MAA capaz de detectar el antígeno 3 del cáncer de próstata. [10]

Otro problema que presentan los biosensores es el tiempo de vida útil, ya que a medida que pasa el tiempo su capacidad de detección se va deteriorando. El genosensor que detecta la presencia de VPH es el que mayor tiempo de vida útil ha demostrado obteniendo resultados aceptables un mes después de su fabricación. [8]

Conclusiones

Los genosensores son una apasionante promesa de futuro que disminuirán las tasas de mortalidad al permitir una detección temprana del cáncer, un seguimiento de la enfermedad en tiempo real y la posibilidad de llegar a personas de ambientes rurales o países en vía de desarrollo. Además, es una tecnología en continuo avance que busca ser barata y sostenible, como demostró la investigadora María Moccia al desarrollar un genosensor electroquímico en papel capaz de detectar micro ARN. [4] Una tecnología que se puede exportar a otros campos como el de la industria alimentaria, el control sanitario o la evaluación medioambiental. En base a todo lo expuesto, esperamos que pronto estos dispositivos lleguen a término y que con sólo una gota de sangre se puedan salvar vidas.

Bibliografía

1. Farshchi F, Hasanzadeh M. Efficient diagnosis of cancer using biosensing of circulating tumor DNAs(ctDNA): Recent progress and challenges. *Microchem J.* 2023;193(109076):109076. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2023.109076>
2. Dara H, Mali M, Aher H, Patil P, Sahu B, Arya N. Point of care diagnostics for cancer: Recent trends and challenges. En: Maurya PK, Chandra P, Editors. *Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics.* Woodhead Publishing; 2022. p. 29-64.
3. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016; 34(5): 547-555. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907374/>
4. Moccia M, Caratelli V, Cinti S, Pede B, Avitabile C, Saviano M, et al. Paper-based electrochemical peptide nucleic acid (PNA) biosensor for detection of miRNA-492: a pancreatic ductal adenocarcinoma biomarker. *Biosens Bioelectron.* 2020;165(112371):112371. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112371>
5. Garcia-Melo LF, Morales-Rodríguez M, Madrigal-Bujaidar E, Madrigal-Santillán EO, Morales-González JA, Pineda Cruces RN, et al. Development of a nanostructured electrochemical genosensor for the detection of the K-ras gene. *J Anal Methods Chem.* 2022:1-12. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2022/6575140/>
6. Koyappayil A, Lee M-H. Ultrasensitive materials for electrochemical biosensor labels. *Sensors (Basel).* 2020;21(1):89. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/1/89>
7. Carr O, Raymundo-Pereira PA, Shimizu FM, Sorroche BP, Melendez ME, de Oliveira Pedro R, et al. Genosensor made with a self-assembled monolayer matrix to detect MGMT gene methylation in head and neck cancer cell lines. *Talanta.* 2020;210(120609):120609. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120609>
8. Rawat R, Singh S, Roy S, Kumar A, Goswami T, Mathur A. Design and development of an electroanalytical genosensor based on Cu-PTCA/rGO nanocomposites for the detection of cervical cancer. *Mater Chem Phys.*

- 2023;295(127050):127050. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127050>
9. Cai C, Guo Z, Cao Y, Zhang W, Chen Y. A dual biomarker detection platform for quantitating circulating tumor DNA (ctDNA). *Nanotheranostics* 2018; 2(1):12-20. Disponible en:
<https://www.ntno.org/v02p0012.htm>
10. Raymundo-Pereira PA, de Oliveira Pedro R, Carr O, Melendez ME, Gobbi AL, Helena de Oliveira Piazzetta M, et al. Influence of the molecular orientation and ionization of self-assembled monolayers in biosensors: Application to genosensors of prostate cancer antigen 3. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*. 2021;125(1):498-506. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09055>