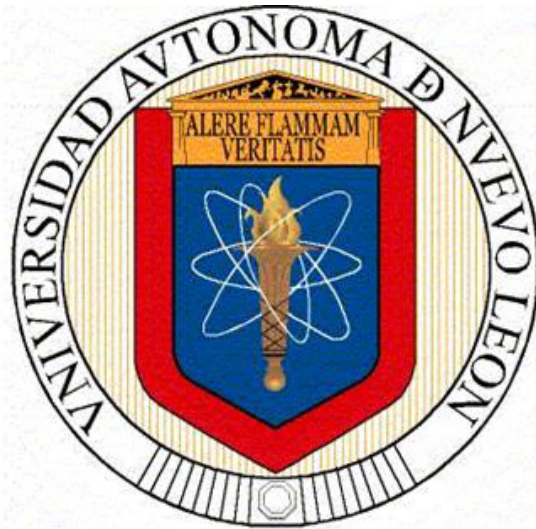


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR BASADO EN
NANOCONJUGADOS DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO Y
PAPAÍNA PARA LA DETECCIÓN DE CISTATINA C (Cys C)**

POR

LBG. AZAEL ADRIÁN CAVAZOS JARAMILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

ENERO, 2020

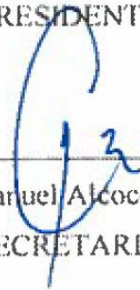
DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR BASADO EN
NANOCONJUGADOS DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO Y
PAPAÍNA PARA LA DETECCIÓN DE CISTATINA C (Cys C)

COMITÉ DE TESIS



Dra. Itza Eloísa Luna Cruz

PRESIDENTE



Dr. Juan Manuel Alcocer González

SECRETARIO



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

VOCAL 1



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

VOCAL 2



Dr. Edgar Mendoza Gamboa

VOCAL 3

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR BASADO EN
NANOCONJUGADOS DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO Y
PAPAÍNA PARA LA DETECCIÓN DE CISTATINA C (Cys C)

DIRECCIÓN DE LA TESIS



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

DIRECTOR

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología.

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	II
AGRADECIMIENTOS	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Diabetes.....	3
2.1.2 Estadísticas de la diabetes	3
2.1.2.1 Estadísticas de la diabetes en un contexto internacional	3
2.1.2.2 Estadísticas de la diabetes en México	4
2.2 Complicaciones asociadas a la diabetes.....	5
2.2.2 Retinopatía.....	5
2.2.3 Neuropatía	5
2.2.4 Problemas cardiovasculares.....	6
2.2.5 Nefropatía	6
2.3 Marcadores de daño renal	7
2.3.1 Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).....	7
2.3.2 Molécula-1 de lesión renal (KIM-1).....	7
2.3.3 Uromodulina.....	8

2.3.4 Creatinina	8
2.3.5 Cistatina.....	9
2.3.5.1 Clasificación de las cistatinas	9
2.3.5.1.1 Cistatinas Tipo 1	9
2.3.5.2 Cistatinas Tipo 2.....	10
2.3.5.3 Cistatinas Tipo 3.....	10
2.3.5.4 Cistatinas Tipo 4.....	11
2.4 Cistatina C (CysC)	11
2.4 Nanopartículas.....	12
2.4.1 Nanopartículas para la detección de moléculas	13
2.4.2 Nanopartículas para la detección de glucosa.....	14
2.4.3 Nanopartículas para la detección de creatinina	14
2.4.4 Nanopartículas de carbono	15
2.5 Electrodo Serigrafados	15
2.5.1 Electrodo serigrafados de carbono.....	16
2.6 Biosensores	16
2.7 Clasificación de biosensores	17
2.7.1 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor	17
2.7.1.2 Biosensores enzimáticos.....	18
2.7.1.3 Biosensores basados en proteínas receptoras	18
2.7.1.4 Biosensores basados en anticuerpos	18
2.7.1.5 Genosensores	19
2.7.1.6 Citosensores.....	19
2.7.2 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor.....	19
2.7.2.1 Biosensores ópticos	20
2.7.2.2 Biosensores termométricos.....	20

2.7.2.3 Biosensores sensibles a masa	20
2.7.2.4. Biosensores electroquímicos	21
2.7.2.4.1 Biosensores amperométricos	21
2.7.2.4.2 Biosensores potenciométricos	22
2.7.2.4.3 Biosensores conductimétricos	22
2.7.2.4.4 Biosensores voltamétricos	22
2.8 Biosensores para la detección de Cys C.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OJETIVO GENERAL	26
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
6.1 Diagrama general	27
6.2 Síntesis de nanopartículas de carbono Fe ₃ O ₄ por coprecipitación	27
6.2.1 Síntesis de nanopartículas multicore por coprecipitación	28
6.3 Preparación de los nananoconjugados CNPs/Papaína e inmovilización en el electrodo de trabajo.....	28
6.4 Detección de Cys C	28
6.5 Caracterización del biosensor	29
7. RESULTADOS.....	30
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS.....	51
11. REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos para el recubrimiento de magnetita con carbono y su análisis mediante DLS.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama experimental general del proyecto.
- Figura 2.** DLS de CNPs resuspendidas en H₂O MQ obtenidas a partir del método de síntesis por coprecipitación.
- Figura 3.** DLS CNPs resuspendidas en H₂O MQ obtenidas a partir del método de síntesis por coprecipitación.
- Figura 4.** DLS de la magnetita sonicada con glucosa por 2 horas.
- Figura 5.** DLS de las CNPs sintetizadas en presencia de nitrógeno.
- Figura 6.** Caracterización de las CNPs.
- Figura 7.** Determinación de la propiedad magnética de las CNPs multicore.
- Figura 8.** Microscopia electrónica de transmisión de CNPs multicore de óxido de hierro.
- Figura 9.** FTIR de las CNPs multicore.
- Figura 10.** Caracterización de las CNPs y nanoconjugados.
- Figura 11.** FTIR de los nanomateriales.
- Figura 12.** Representación del prototipo de biosensor.
- Figura 13.** Voltamograma cíclico del dispositivo SPCE.
- Figura 14.** Caracterización electroquímica de los componentes del biosensor mediante voltamperometría cíclica.
- Figura 15.** Caracterización electroquímica de la repetitividad del biosensor mediante voltamperometría cíclica.
- Figura 16.** Obtención de la curva de detección de Cys C mediante voltamperometría cíclica.
- Figura 17.** Análisis de suero del primer paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica.

Figura 18. Análisis de suero del segundo paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica.

Figura 19. Análisis de suero del tercer paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μL	microlitro
μA	micro amperes
CNPs	Nanopartículas de carbono
CV	Voltamperometría cíclica
g	gramos
H	horas
I	corriente resultante
M	molaridad
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mV	milivolts
nm	nanómetros
SPCE	Electrodo de carbono serigrafiado
V	volts

RESUMEN

Las enfermedades renales se han posicionado como cuadros patológicos altamente limitantes, que al encontrarse relacionada su aparición con cuadros clínicos tan comunes como la diabetes, su prevalencia ha continuado aumentando en años recientes. Una detección oportuna de este padecimiento permitiría proporcionar a los pacientes que la padezcan una mejor calidad de vida, retrasando el desarrollo de la enfermedad o bien reduciendo sus limitaciones físicas. Es en este sentido que los biosensores toman importancia como herramientas para la detección de biomarcadores asociados al daño renal, dada la portabilidad y simpleza en su uso. La proteína humana Cistatina C (Cys C) se ha posicionado como uno de los biomarcadores de enfermedad renal más prometedores, debido a que mantiene una concentración estable en orina y suero a pesar del efecto de factores como la edad, la dieta o el sexo. En este trabajo, nanopartículas de carbono sintetizadas mediante coprecipitación química y caracterizadas mediante microscopia electrónica de transmisión, así como por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) fueron funcionalizadas con papaína (cisteína proteasa) mediante la unión covalente de sus grupos carboxilos con los grupos amino de la papaína usando los agentes 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, corroborando su formación mediante FTIR. Los nanocomplejos fueron fijados en un electrodo de carbono serigrafado usando Nafion al 5% y su inmovilización se determinó mediante voltamperometría cíclica usando $K_4Fe(CN)_6$, 10 mM como indicador redox.

Cinco concentraciones conocidas de Cys C en un rango de 0.9 a 3.0 $\mu\text{g/mL}$ fueron usadas para establecer una curva de calibración del biosensor, midiéndose la interacción entre los nanoconjugados y la Cys C mediante voltamperometría cíclica, obteniendo valores de I en un rango de 61.77 a 51.11 μA . Posterior a la obtención de la curva de calibración de Cys C; tres muestras de suero provenientes de donadores sin antecedentes de daño renal diagnosticado fueron usadas para retar al sistema, siendo posible localizar los valores I en la curva de calibración; los valores I oscilaron entre 52.57 a 74.88, 45.50 a 75.31 y 42.48 a 79.17 μA respectivamente. El sistema de biosensor desarrollado presento la cualidad de detectar a concentraciones de Cys C incluso ante muestras provenientes de pacientes, por lo tanto, un biosensor basado en biomarcador Cistatina C puede ser una plataforma prometedora para diseñar detectores portátiles de enfermedades renales.

ABSTRACT

Renal diseases have been positioned as highly limiting pathological conditions, which to be related to common clinical conditions as diabetes, its prevalence has been increased in recent years. An early detection of this condition would allow to provide patients with a better life quality, delaying disease development or reducing their physical limitations. It is in this way that biosensors are important kidney damage biomarkers detection tools, given portability and simplicity in their use. Human protein Cystatin C (Cys C) has been positioned as one of the most promising kidney disease biomarkers, due to maintain a urine and serum stable concentration, despite the factor effect such as age, diet or sex. In this work, carbon nanoparticles synthesized by chemical coprecipitation and characterized by transmission electron microscopy and by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were conjugated with papain (cysteine protease) whose amino groups were covalently bound to carboxyl groups on carbon-nanoparticles using 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). The formed nanocomplexes were characterized by FTIR. The nanocomplexes were fixed on a screen-printed carbon electrode using 5% Nafion and their immobilization was determined by cyclic voltammetry using 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ as a redox indicator.

Five known Cys C concentrations in a range of 0.9 to 3.0 $\mu\text{g/mL}$ were used to establish a biosensor calibration curve, measuring the interaction between nanoconjugates and papain by cyclic voltammetry obtaining current values ranging from 61.77 to 51.11 μA . After obtaining the Cys C calibration curve, three serum samples from donors without a history of diagnosed renal damage were used to challenge the system, being possible to locate the I values in the calibration curve where the I values ranged from 52.57 to 74.88, 45.50 to 75.31 and 42.48 to 79.17 μA respectively. The developed biosensor system presented the quality to detect Cys C concentrations even to samples from patients, therefore, a Cystatin C biomarker-based biosensor can be a promising platform to design portable kidney disease detectors.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes se ha convertido en una de las problemáticas de mayor urgencia en la sociedad dada su alta prevalencia y la tasa de crecimiento a nivel mundial. En el año del 2014, la organización mundial de la salud estimó que cerca de 422 millones de adultos presentaban esta enfermedad. Las muertes causadas por este padecimiento en el año 2012 ascendieron a 1.5 millones, aunadas a las 2.2 millones de muertes derivadas de complicaciones asociadas a su presencia. México se posiciona como una de las principales naciones en donde los estragos provocados por la diabetes se han visto acrecentados en años recientes. Diversos organismos como la Organización Mundial de la Salud, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, así como el Instituto Nacional de Estadística y Geografía han hecho públicos estudios en los cuales se evidencia el aumento en la incidencia de personas con diabetes, el aumento en la mortalidad y los altos costos económicos derivados de los tratamientos asociados a este padecimiento en nuestro país.

Entre la gama de enfermedades asociadas al padecimiento de la diabetes, destacan las nefropatías, no solo por las limitaciones físicas que propicia en las personas que la padecen, sino por la dificultad que ha representado su diagnóstico en etapas tempranas, así como la falta de estandarización de protocolos sensibles y de fácil aplicación que permitan la detección y análisis de biomarcadores asociados al daño renal. Entre las diversas moléculas que han sido consideradas como posibles biomarcadores de daño renal, la Cistatina C se ha posicionado como una de las más prometedoras al ser capaz de dar indicios de un daño renal temprano, así como no guardar relación entre los hábitos alimenticios del paciente, masa muscular y edad. Diversos reportes han establecido como la variación de Cistatina C en suero ha presentado mayor relación con respecto al nivel de daño renal, volviendo más precisos ensayos como la tasa de filtración glomerular cuando entre los elementos a tomarse en cuenta se agrega la Cistatina C.

Debido al tiempo y consideraciones que deben tomarse en cuenta al momento de analizar algunos de los biomarcadores de daño renal por pruebas convencionales es que se tiene la necesidad de desarrollar tecnologías como biosensores capaces de reducir costos y tiempos de detección de moléculas de interés. Es en este sentido que la nanotecnología se ha

alzado como una de las herramientas más prometedoras para hacer frente a esta necesidad, en especial las nanopartículas de carbono dada sus capacidades electroquímicas han recibido en años recientes la atención de diversos grupos de trabajo para su empleo en el desarrollo de biosensores. El bajo costo en su síntesis, ser químicamente inertes y su estabilidad son algunas de las características más ventajosas que presenta el uso de este tipo nanopartículas. Es por estas razones que el desarrollo de un prototipo de biosensor basado en nanoconjugados nanopartículas de carbono y de papaína la cual es una molécula de bajo costo económico y capaz de fijarse a Cistatina C de forma específica toma importancia en su función como una herramienta en la detección de daño renal temprano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes

Es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad crónica provocada por la incapacidad del páncreas para producir insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la que produce. La diabetes se encuentra entre las cuatro enfermedades no transmisibles con carácter de intervención prioritaria dada su prevalencia (Organización Mundial de la Salud, 2016).

La diabetes puede clasificarse principalmente en Tipo 1 y Tipo 2 aunque existen variantes de esta. La diabetes Tipo 1, también conocida como insulino dependiente o juvenil se caracteriza por una producción deficiente de insulina. Las causas de este tipo de diabetes son aún desconocidas, aunque se conocen factores de riesgo que pudieran desembocar en la aparición de esta patología. La diabetes Tipo 2 conocida como no insulino dependiente o de edad adulta es debido al uso ineficaz de la insulina por el organismo y constituye el mayor porcentaje de casos a nivel mundial, se sabe qué factores como sobre peso y sedentarismo se encuentran relacionados con el desarrollo de esta enfermedad. Algunas de la variante de diabetes reportadas se encuentra la conocida como diabetes gestacional, la cual consiste en una hiperglucemia presente durante el embarazo alcanzando niveles superiores a los normales, pero sin atravesar el umbral para poder ser diagnosticado como un caso de diabetes. Aunque estas tres clases de diabetes son las más comunes, no son las únicas, existiendo reportes de diabetes relacionadas a fibrosis quística, diabetes secundaria a fármacos y la diabetes de tipo MODY enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

2.1.2 Estadísticas de la diabetes

2.1.2.1 Estadísticas de la diabetes en un contexto internacional

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud en 2014 cerca de 422 millones de adultos a nivel mundial presentaban diabetes, contrastando la prevalencia mundial (normalizada por edades) registrada desde los años 80 hasta el 2014 se presenta un aumento del 4.7% al 8.5% en la población adulta, por ende, se establece que existe un incremento en los factores de riesgos asociadas al desarrollo de esta enfermedad

tales como obesidad y sobre peso. En el año 2012, la diabetes fue causante de 1.5 millones de muertes, aunado a provocar 2.2 millones de muertes al incrementar la susceptibilidad a enfermedades cardíacas. Estadísticas globales han previsto que las muertes causadas por diabetes podrían ver duplicadas para el año 2030 (Encarnación Cruz, 2016).

En 2012, la diabetes propició un costo mundial de aproximadamente \$471,000 millones de dólares en gastos de salud. Las zonas de América del norte y el Caribe poseen los mayores costos con relación al tratamiento de la diabetes, en estas zonas la prevalencia de esta enfermedad ronda el 10.5% en la población adulta. Para el año 2030 se espera que el costo de la diabetes y enfermedades concomitantes constara de 490,000 mil millones de dólares (Federación Internacional de Diabetes, 2012).

2.1.2.2 Estadísticas de la diabetes en México

México ocupa la sexta posición entre las naciones con mayor incidencia de este padecimiento, la diabetes se ha convertido en un problema grave de salud pública, pues se estima que cerca de 10% de la población mexicana presenta este padecimiento, aunque se estima que este porcentaje podría verse duplicado por el alto número de personas que padecen esta enfermedad y no han sido diagnosticadas (Encarnación Cruz, 2016).

Para el año 2014 reportes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía mostraron el incremento constante en la mortalidad causado por la diabetes desde el año de 1984 alcanzando las 94,029 muertes posicionándose como la principal causa de muerte a nivel nacional. Un estudio posterior realizado por el mismo organismo reportó 16,785 muerte tan solo en el año 2016, lo cual consolida a la diabetes como una emergencia de salud en México (INEGI, 2018b).

Según los datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, México presenta el mayor crecimiento en la mortalidad por diabetes mellitus entre los países que se encuentran dentro de esta organización. Con base a las proyecciones presentadas por Encarnación Cruz mediante el uso de los datos presentados por la OCDE y como supuesto que la tasa de crecimiento de las defunciones se mantuviera al mismo ritmo, para el año 2020 se presentarían 126,000 muertes por diabetes, cifra que representaría 5 veces más que las registradas apenas en el año 1990. Con base a la tasa de defunciones en los estados de la

República Mexicana, solo cinco estados se encuentran dentro del promedio de defunciones presentado por la OCDE (0-60 defunciones por cada 100,000 habitantes), el resto de ellos se encuentra entre las categorías de preocupante (60-70 defunciones), alarmante (70-80 defunciones) o urgente (80 o más defunciones).

2.2 Complicaciones asociadas a la diabetes

La importancia en el control de la diabetes se ve aumentada al provocar diversas complicaciones y enfermedades asociadas a la ineficacia o falta de tratamiento de esta enfermedad, pues un alto nivel de glucosa en sangre puede derivar en retinopatías, neuropatía, problemas cardiovasculares y nefropatías.

2.2.2 Retinopatía

Es considerada la complicación más frecuente derivada de la diabetes mellitus guardando relación con el tiempo de evaluación y el control metabólico de la enfermedad. La retinopatía diabética representa la segunda causa de ceguera en Latinoamérica solo por detrás de la catarata. El manejo eficaz de los niveles en sangre de glucosa producidos por padecer diabetes es uno de los métodos de control más eficaces ante esta complicación (Covarrubias, 2017). En México, según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en 2012 un 47.6% de los pacientes con diabetes externaron tener disminución visual, 13.9% fueron comprobados con daños en la retina y 6.6% con pérdida de vista.

2.2.3 Neuropatía

La neuropatía es una de las complicaciones más comunes tras mantener de forma prolongada altos niveles de azúcar en sangre. El tipo de neuropatía es mayor en la periférica, en la cual los nervios de más afectados son los nervios presentes en los pies, causando dolor, hormigueo y pérdida de sensibilidad en estas extremidades. Existen preocupaciones adicionales cuando una persona desarrolla la neuropatía periférica, pues la pérdida de sensibilidad en extremidades puede derivar en la falta de percepción de lesiones, causando laceraciones e infecciones que, dado el retraso en procesos de cicatrización presente en personas diabética, pueden derivar en la amputación del miembro (Inzucchi and Umpierrez, 2016). Datos publicados por ENSANUT en el año 2012 presentaba que cerca del 7.2% de

pacientes con diabetes mellitus tenían úlceras en pies y que el 2% habían sufrido de amputación. Por otro lado, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la tasa de amputación de las extremidades inferiores en México era de 111.1 por cada 100,000 pacientes con diabetes en el año 2013 (Cisnero *et al.*, 2016).

2.2.4 Problemas cardiovasculares

El término de problema cardiovascular se refiere a padecimientos que puedan comprometer el funcionamiento normal del corazón y los vasos sanguíneos, y representan la causa número uno de muerte en México. El impacto de la hiperglicemia en la predisposición a enfermedades cardiovasculares se encuentra bien estudiado y se sabe que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen el doble de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares tales como infarto al miocardio, accidentes cerebro vasculares y enfermedad vascular periférica siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de muerte en pacientes con diabetes con un 80% de los decesos causados por estos padecimientos (Abdul-Ghani *et al.*, 2017). Tal es la magnitud de la problemática en nuestro país derivada de los problemas cardiovasculares que se estima cada tres minutos ocurre un ataque cardíaco. Aun no se ha reportado de forma fehaciente el número de personas en México que presentan problemas cardiovasculares derivados de la mala atención a un cuadro de diabetes (Rosas-Peralta *et al.*, 2017).

2.2.5 Nefropatía

Las nefropatías o enfermedades renales conforman un grupo importante de las complicaciones que puede representar un mal manejo de los niveles de azúcar en sangre pudiendo conllevar el desarrollo de una enfermedad renal crónica (CKD). Se sabe que entre el 10 y el 20% de los pacientes con diabetes mueren por insuficiencia renal (Encarnación Cruz, 2016). De acuerdo con los resultados de ENSANUT 2012, al 1.4% de pacientes con diabetes mellitus se les realizan diálisis peritoneales. Se estima que en nuestro país cada año se desarrollan 40,000 casos nuevos de insuficiencia renal atribuidos en gran medida a la falta de cultura preventiva, reportándose con una tasa de crecimiento del 11% anual (Mendez-Duran *et al.*, 2010). La incidencia de cuadros clínicos como la CKD, así como la aplicación del tratamiento convencional de diálisis o trasplantes de riñón, pudieran verse disminuidas de

forma importante mediante un aumento en la precisión y veracidad de los métodos usados para indicar los niveles de funcionamientos de los riñones. Existen complicaciones en el reconocimiento temprano de CKD debido a la precisión de los protocolos para la medición de creatinina empleados en diversos laboratorios clínicos tal como demostraron Ruiz-Arenas y Sierra-Amor en su reporte del año 2017 en donde al realizar un estudio piloto para determinar la precisión y confiabilidad de las pruebas para cuantificación de creatinina encontraron que el 58% de su población a analizar no cumplían con los estándares internacionales.

2.3 Marcadores de daño renal

2.3.1 Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos es una de las primeras moléculas que se desencadena en el desarrollo renal, convirtiendo las células mesenquimales embrionarias en células epiteliales para formar túbulos y completando el desarrollo de las nefronas (Yang *et al.*, 2002). El nivel de expresión de NGAL se ha relacionado con el grado de disfunción renal y se cree puede ayudar a indicar el nivel de riesgo de pacientes a presentar una disminución rápida de la función renal. La presencia de NGAL de forma urinaria ha demostrado servir como predicción de una lesión renal antes de los cambios detectables en la tasa de filtración glomerular (TFG). En el año de 2007, Mitsnefes y colaboradores demostraron que los niveles plasmáticos de NGAL se correlacionaron inversamente con la TFG en niños con CKD con mejores resultados hasta ese entonces que el uso de cistatina C como un biomarcador ligado a daño renal, en pacientes con función renal por debajo de 30 ml/min. También se ha sugerido que los niveles aumentados de NGAL podrían estar asociados con daño detectable que ocurre en el asa de Henle y en el túbulo contorneado distal.

2.3.2 Molécula-1 de lesión renal (KIM-1)

La molécula-1 de lesión renal es una proteína transmembranal cuya presencia se ha detectado cuando existe daño isquémico o tóxico en riñón. Esta molécula no ha sido detectada en orina de pacientes sanos por lo cual comenzó a ser usada como un marcador que funge para discrepar entre pacientes con lesiones renales de aquellos que no lo están. KIM-1 se ha relacionado con un rol fisiopatológico en la modulación del daño y reparación tubular

(Sayanthooran *et al.*, 2017). El aumento de la presencia de proteínas en el filtrado glomerular, así como la ulceración de los túbulos son factores que inducen la expresión de KIM-1, por ende, una regulación al alta de esta proteína es consecuencia de un daño proximal tubular en la nefrona. Entre los estudios que han empleado KIM-1 como un marcador de CKD resalta el de Silva *et al.*, donde se demostró la utilidad de esta molécula en la detección temprana de CKD en comunidades agrícolas en Sri Lanka.

2.3.3 Uromodulina

Es una glicoproteína relacionada con la protección de células tubulares de infecciones del tracto urinario involucradas en pielonefritis crónica y urolitiasis (Säemann *et al.*, 2005). Una reducción en la cantidad de esta molécula se ha encontrado en pacientes con fibrosis intersticial o atrofia tubular durante la CKD por ello la relación que conllevan los niveles de uromodulina con respecto al estado de avance de CKD han posicionado a esta molécula como un biomarcador prometedor. Se sabe que la concentración de uromodulina en pacientes con CKD disminuye de forma considerable con base al desarrollo de la enfermedad, siendo que en CKD de etapa 2 las concentraciones de esta molécula se encuentran en un promedio de 300 ng/mL mientras que en la fase 5 los niveles de uromodulina en sangre ya son imperceptibles. La disminución en la cantidad de uromodulina se ha relacionado con el deterioro en la función tubular debido al daño renal, así como presentar una correlación con la eGFR así como con la proteinuria indicando ser un predictor potencial de la progresión de CKD (Rysz *et al.*, 2017).

2.3.4 Creatinina

La creatinina es un producto derivado de la degradación del fosfato en los músculos y se trata de un indicador de la salud renal debido a que su excreción es mediada por los riñones, situación por la cual ha sido catalogada desde hace años como un biomarcador del estado de salud de los riñones. Cuando se presenta daño a nivel renal, los niveles de creatinina en sangre se ven aumentados, pero disminuidos en orina, este evento se usa para calcular el aclaramiento de creatinina correlacionado con la tasa de filtración glomerular siendo la forma más común en que los laboratorios clínicos realizan análisis para estimar el daño renal de los pacientes (Ruiz-Arenas, 2017). La concentración estándar de creatinina en el organismo es

de 40-150 μM , para valores por mayores a 500 μM se considera la existencia de un daño renal severo. En gran parte de las ocasiones el análisis de creatinina se realiza mediante pruebas colorimétricas, las cuales pueden ser afectadas por diversos metabolitos y drogas encontradas en el sistema, tales como glucosa, fructosa, cuerpos cetónicos, ácido ascórbico y cefalosporinas. Por estas razones desde hace ya algunos años se ha buscado la implementación de métodos basados en enzimas para aumentar la especificidad, pero aumentando la complejidad de los métodos a realizar. Existen reportes en donde se establece como las condiciones mencionadas pueden afectar el diagnóstico acertado acerca de la condición renal de los pacientes, es por ello que impera la necesidad de eficientizar los métodos de detección y cuantificación de creatinina o de emplear nuevos marcadores de daño renal como los previamente mencionados (Åkerblom *et al.*, 2015).

2.3.5 Cistatina

El término Cistatina fue acuñado en el año 1981 por Alan Barret, para describir a una pequeña proteína aislada de claras de huevos con actividad para inhibir la actividad de cisteína proteasas lisosomales. Posteriormente proteínas capaces de modular e inhibir cisteína proteasas y que evolucionaron de un gen ancestro en común, fueron agrupadas en una nueva superfamilia de proteínas llamada superfamilia de cistatinas. Análisis bioinformáticos han permitido esclarecer tres regiones conservadas entre las diversas cistatinas: un residuo de glicina en la región N-terminal (G11 en la numeración de cistatina C humana), un motivo QXVXG en un bucle de horquilla y un motivo PW en un segundo bucle. Estas regiones forman una superficie en la molécula de cistatina que puede acoplarse con el sitio de unión al sustrato de las enzimas de la familia C1 (similar a la papaína). Estas similitudes en todo el grupo, tomadas junto con su actividad común, se han considerado suficientes para ubicar a las cistatinas dentro de una sola superfamilia, la superfamilia de Cistatina (Barret, 1981; Mussap and Plebani, 2014).

2.3.5.1 Clasificación de las cistatinas

2.3.5.1.1 Cistatinas Tipo 1

Los miembros de la familia 1 son conocidos como stefins, localizadas de manera intracelular y no son sintetizadas como pre-proteínas con un péptido señal. Las Cistatinas A

y B humanas, así como las Cistatina α y β de rata son las proteínas representativas de esta familia. Estas proteínas poseen cerca de 100 residuos de longitud y difieren de las cistatinas del tipo dos en dos aspectos; la ausencia de puentes disulfuro en el loop 2 de las α helices y la presencia de nueve residuos de aminoácidos en la región C terminal. La Cistatina A humana fue aislada por primera vez de células polimorfonucleares y es codificada por el gen *cystatin A*; se sabe que su localización cromosómica se encuentra en la región 3q21 mientras que el gen codificante de la Cistatina B se encuentra en la región 21q22.3 (Brzin *et al.*, 1983; Hsie WT *et al.*, 1991).

2.3.5.2 Cistatinas Tipo 2

La familia de Cistatinas Tipo 2 es la que mayor número de miembros posee, entre ellos C, S, SN, SA, D, E/M y F (Mussan and Plebani, 2014). Estas proteínas presentan de 110-125 aminoácidos de longitud y cuatro residuos de cisteínas involucrados en la formación de dos puentes disulfuro característicos de esta familia (Esnard *et al.*, 1990). A diferencia de la familia tipo 1, estas proteínas son traducidas con péptidos señal, por lo cual son consideradas como extracelulares. Las funciones de este tipo de cistatinas son muy variadas; la cistatina D se considera un componente adicional del sistema de protección no inmune en la cavidad oral, por otro lado, la Cistatina F conocida como leucocistatina se expresa en células del sistema inmune como células-T, células pre-monocíticas y células dendríticas activadas, derivadas de células madre. Se han asociado función y expresión tejido específica de los diversos tipos de cistatinas debido a situaciones como la distribución tisular restringida de la cistatina S en saliva y la F/leucocistatina en el sistema inmune en contraposición con la expresión ubicua de E/M pero solo en piel durante el estado fetal y células de la membrana amniótica, develando una función en el desarrollo embrionario (Freiie *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 2000; Zeeuwen *et al.*, 2001).

2.3.5.3 Cistatinas Tipo 3

Las cistatinas pertenecientes a la familia 3 se conocen como cininógenos. Son proteínas intravasculares, presentes en el plasma y la secreción mamíferos. Los cininógenos representan los miembros más complejos de la superfamilia de cistatinas y contienen tres dominios similares a la Cistatina, cada uno de estos tres dominios tiene dos enlaces disulfuro

en posiciones homólogas a las de las cistatinas tipo 2. Se han identificado tres tipos de cininógenos: los de bajo y alto peso molecular, así como el cininógeno T. Al igual que el resto de cistatinas, los cininógenos se caracterizan por su habilidad de inhibir cisteín proteasas (Kellerman *et al.*, 1989).

2.3.5.4 Cistatinas Tipo 4

También conocidos como fetuinas, los integrantes de la familia 4 se han identificado como proteínas principales durante la vida fetal, en sangre y cerebro, aunque se sabe que los cambios asociados con el desarrollo en los niveles de fetuina varían significativamente entre las especies. Las fetuinas se consideran proteínas clave en varias vías metabólicas, incluida la regulación de la osteogénesis y la resorción ósea. Estas proteínas también llevan a cabo la tarea de opsonizar las moléculas catiónicas que desactivan macrófagos y son clave en la etapa de recuperación de una respuesta de fase aguda a la inflamación sistémica (Deneke *et al.*, 2003; James *et al.*, 1996).

2.4 Cistatina C (CysC)

La cistatina C (CysC) es una proteína descrita en 1961 por Jorgen Clausen de concentración plasmática y cuya eliminación es exclusivamente mediante la función renal. La proteína Cys C consta de un peso molecular de 13.3 kDa, constituida por una cadena de 120 aminoácidos, contiene cuatro residuos de cisteína unidos a través de dos puentes disulfuro característicos, Cys 73–83 y Cys 97–117. Dada su codificación por el gen CST3 ubicado en el cromosoma 20, puede ser producida en las células nucleadas, presentando una tasa de síntesis estable y de amplia distribución en tejidos. Al ser una proteína cisteínproteasa, desempeña la función de inhibir catepsinas involucradas en el catabolismo del colágeno y de la matriz celular. Por el pequeño tamaño que presenta (13.3 kDa) y por el punto isoeléctrico que posee (9.3), su filtración se lleva a cabo de forma libre mediante el glomérulo, reabsorbiéndose en el túbulo proximal siendo catalizado por las células tubulares (Bangiovanni *et al.*, 2015).

Se ha descrito de forma completa el sitio de actividad de Cys C en humanos, denotando la presencia de tres motivos conservados. El primer motivo corresponde a los residuos L9-V-G11 en la región N-terminal; el segundo a los residuos Q55-I-V-A-G59 en un

bucle de horquilla y tercero a los residuos P105-W106. Estos tres motivos están localizados de forma cercana y estérica el uno del otro, formando una estructura en forma de cuña que puede insertarse en el sitio activo de las cisteínas proteinasas diana (Mason *et al.*, 1998).

En años recientes su empleo como un marcador de daño renal en etapas tempranas ha tomado mayor relevancia, debido a que la concentración de Cys C en suero (0.53-1.02 mg/L) y en orina (0.03-0.30 mg/L) no se ve influenciada por edad, sexo o ingesta de proteínas, factores que si influyen en la variación de otras moléculas usadas como marcadores de daño renal (Finney and Price, 2000; Grubb *et al.*, 2005; Shlipak *et al.*, 2006). La relación entre el aumento de Cys C en suero con respecto a la tasa de filtración glomerular disminuida ha sido una de las cualidades tomadas en cuenta para establecer esta molécula como un biomarcador de daño renal temprano (Morales *et al.*, 2018).

2.4 Nanopartículas

Definidas como partículas que presentan un tamaño pequeño (1-100 nm), el cual es medido a una escala nanométrica, estas han sido implementadas en diferentes áreas de la investigación, puesto a que se caracterizan por tener distintas propiedades que las hacen adecuadas para una tarea en específico. El tamaño nanométrico les permite involucrarse en distintos procesos biológicos e interactuar con las moléculas, otra cualidad que es dependiente del tamaño de la nanopartícula es la determinación de ser partículas magnéticas, catalíticas, termodinámicas o electroquímicas, además, dependiendo del material con el que están elaboradas las nanopartículas también se determina las propiedades físicas y químicas específicas que presentarán. Una de las características que presentan las nanopartículas es el poder evadir el sistema retículo endotelial, debido a que es posible manipular la composición de su superficie así como el tamaño (Faraji and Wipf, 2009; Sanvicens and Marco, 2008).

Podemos encontrar nanopartículas elaboradas a base de materiales orgánicos obteniendo liposomas, dendrímeros, nanomateriales de carbono y micelas, estas presentan una excelente circulación, penetración y difusión (Sanvicens and Marco, 2008).

Por otro lado, las nanopartículas inorgánicas se encuentran elaboradas a base de sílice o albúmina, sin embargo, el núcleo puede estar compuesto de distintos materiales tales como los metales, óxidos o sulfuros metálicos. Dentro de esta clasificación se encuentran las

nanopartículas magnéticas, puntos cuánticos, nanopartículas de poliestireno y metálicas (oro, plata, níquel y óxido de titanio) (Faraji and Wipf, 2009).

Las nanopartículas poliméricas es otro tipo de nanopartículas empleadas en el área de la medicina, estas están elaboradas a base de polímeros naturales (dextrano y quitosán) o sintéticos (poly(acrilatos), poly(anhídridos), poly(acrilamidas) y poly(ésteres), son utilizadas principalmente en la terapia para la administración de fármacos, al proveerle protección y control al agente acarreado (Gómez-Gaete, 2014). Este tipo de nanopartículas pueden ser biodegradables y biocompatibles, siendo capaces de reducir la inmunogenicidad evitando ser detectadas por el sistema inmune. Algunos de estos polímeros han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el uso como agentes terapéuticos en humanos al ser degradables (Faraji and Wipf, 2009).

Los monocristales son agregados de moléculas capaces de recubrir en forma cristalina algún agente terapéutico, sin embargo este tipo de nanopartículas son implementadas en su mayoría en el área de la ingeniería químicas y en la imagenología que en la medicina (Faraji and Wipf, 2009).

En el campo de la medicina, las nanopartículas presentan distintas aplicaciones en el área de terapia y diagnóstico de diferentes enfermedades, tales aplicaciones son el desarrollo de biosensores, administración de fármacos, tratamientos contra el cáncer y en la imagenología. Además de beneficiarse de las propiedades que proveen las nanopartículas, también podemos enriquecernos de las propiedades que presenta algún agente terapéutico o de diagnóstico, debido a que este es posible anclarlo a la superficie de la nanopartícula o encapsularlo. Entre los tipos de agentes de uso clínico podemos encontrar los oligonucleótidos, ácidos nucleicos, plásmidos, anticuerpos, enzimas, entre otras moléculas (Rawat *et al.*, 2006; Sanvicens and Marco, 2008).

2.4.1 Nanopartículas para la detección de moléculas

Dadas las cualidades intrínsecas mostradas por nanopartículas de diversos materiales, así como la aparición de nuevas propiedades regidas ahora por dimensiones cuánticas han permitido la incursión de nanopartículas en diversas áreas tales como medicina, ambiente, industria por mencionar algunos, pues si algo comparten dichas áreas es que cada una

presenta moléculas de interés a detectar como indicadores de enfermedades, daño ambiental o bien riesgo en procesos de manufactura (Khan *et al.*, 2017).

2.4.2 Nanopartículas para la detección de glucosa

Si existe una molécula a la cual se le haya dedicado un gran número de esfuerzos para lograr una detección más rápida, simple, sensible y no invasiva es la glucosa. Dada la creciente incidencia de desórdenes metabólicos tales como la diabetes, la necesidad por desarrollar nuevas metodologías para una cuantificación más eficaz de esta molécula tomó gran importancia médica. La principal característica que se ha explotado para la detección de glucosa es la habilidad mimética de peroxidasa que presentan las nanopartículas como las de óxido de hierro, las de oro y las de plata (Gao *et al.*, 2017). En el año de 2008, Wei y Wang demostraron como las nanopartículas de óxido de hierro podían fungir como peroxidasa y llevar a cabo una detección indirecta de glucosa presentando especificidad hacia esta molécula, aunque este se trataba de un método colorimétrico, haciendo inexacta su cuantificación.

Hasta la posterior adopción de tecnologías que permitieran fusionar las cualidades miméticas de peroxidasa que presentan en diversos tipos de nanopartículas con dispositivos como electrodos serigrafados, la detección de glucosa alcanzó un potencial comercial importante. La tecnología de IQ biosensor refleja la adopción de tecnologías electrónicas con respecto a materiales con propiedades biomiméticas, siendo esta tecnología capaz de detectar glucosa en saliva del usuario dejando atrás la necesidad de toma de muestra invasiva (Ali *et al.*, 2017).

2.4.3 Nanopartículas para la detección de creatinina

Son diversos los intentos que se han llevado a cabo para lograr la detección de creatinina en diversos tipos de muestras mediante el uso de nanopartículas. Los esfuerzos realizados para lograr esta actividad han sido basados en metodologías que permiten la identificación de forma colorimétrica, principalmente mediante el empleo de nanopartículas de oro, haciendo uso de la actividad sinérgica entre la creatinina y la adenosina con Ag^+ mostrando cambios en la absorción en las nanopartículas de oro (A630 nm/520 nm) con relación a la concentración de creatinina en la muestra (Du *et al.*, 2016). Existen reportes de

metodologías con capacidad de detección de hasta 13.7 mg/L con la condicionante de necesitar una extracción de la creatinina proveniente de la orina del paciente mediante una matriz sólida, situación que, aunque permite una mayor detección y especificidad vuelve más complejo el proceso de detección (Sittiwong and Unob, 2015).

2.4.4 Nanopartículas de carbono

La inclusión de las nanoestructuras abarca grandes campos, entre ellos el ámbito científico el uso de nanopartículas que permitan el envío de fármacos o la detección de moléculas de interés ha acaparado una gran importancia en años recientes. De entre los muy variados tipos de nanopartículas existentes las nanopartículas de carbono han tomado especial importancia, pues mientras otros tipos de nanopartículas requieren para su síntesis agentes dañinos tanto para la salud del personal como para el ambiente, este tipo de nanopartículas no presenta dichas situaciones teniendo lugar su síntesis mediante materiales inocuos como glucosa o quitosano, los cuales además se posicionan en precios menores que los necesarios para la síntesis de nanopartículas de oro o plata abaratando el costo de producción. El uso de estas nanopartículas permite obtener una mayor relación de superficie volumen permitiendo un aumento en la transferencia de electrones, sumado a que dadas las propiedades cuánticas del carbono la conductividad de este elemento se encuentra dentro de las más altas. Al igual que obtener cualidades físicas como las ya mencionadas, las nanopartículas de carbono por lo general están provistas de un núcleo metálico el cual permite una mayor estabilidad en la energía superficial de la nanopartícula. Por lo mencionado se reporta que las nanopartículas de carbono ofrecen ventajas como propiedades electroquímicas, inercia de reacciones, bajo costo y toxicidad, así como una buena estabilidad química (Lai *et al.*, 2017).

2.5 Electrodo Serigrafiado

Los electrodos serigrafiados o SPEs por sus siglas en inglés, son dispositivos desechables elaborados mediante una tecnología de impresión con tintas que posean cualidades electroquímicas sobre sustratos cerámicos o plásticos por lo general. El comienzo en la elaboración de estos soportes recae en el uso de una plantilla que definirá la forma y tamaño del electrodo, y a través de la cual se adicionará la tinta que se requiere ya

sea grafito, oro, carbón, etc. Una vez solidificada la tinta, mediante tratamiento termal, una segunda tinta aísla los sitios conductimétricos del electrodo. La aparición de este tipo de matrices aumento la posibilidad de realizar análisis electroquímicos para los investigadores, debido a que los requerimientos de muestras a analizar y de material necesario son bajas por su proceso de miniaturización a micro volúmenes, además de no requerir infraestructura compleja o personal altamente capacitado para su uso, sin perder de vista la portabilidad que estos sistemas otorgan (Kadara *et al.*, 2009; Mohamed, 2016).

2.5.1 Electroodos serigrafiados de carbono

Como se mencionó con anterioridad la selección de las tintas durante la impresión de los electrodos es dependiente del uso y calidad que se busque otorgar, para un uso electroquímico materiales como el oro y la plata han sido reportados en múltiples trabajos debido a sus buenas cualidades conductimétricas, más sin embargo los costos de su empleo son elevados en comparación con otros materiales: es por ello que el uso de carbono principalmente su alótropo grafeno cobran importancia, esto debido a ser conocido como un buen conductor eléctrico, otorgándoles estas cualidades al dispositivo, en forma dependiente de la obtención del carbono, puede otorgar facilidades para la funcionalización del electrodos, tales como grupo carboxilos activos mediante conjugación química o bien grupos amino si su síntesis se lleva a cabo a partir de elementos como el quitosano (Khaled *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2017).

2.6 Biosensores

Un sensor es definido como un dispositivo capaz de detectar una acción externa bien sea luz, temperatura, presión, etc (Buenguer *et al.*, 2012). Proveniente del latín *sensire* cuyo significado es detectar y *bios* con significado de vida, el termino biosensor por etimología da significado a un sensor cuya fase sensora o detectora es de origen biológico. Por otra parte, la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) le da una definición más específica como un dispositivo que mediante reacciones bioquímicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, organelos tejidos o células puede detectar compuestos químicos a través de señales eléctricas, térmicas u ópticas generalmente (IUPAC, 1997).

Todos los sensores se componen de dos elementos principales el receptor y el transductor. El receptor es el elemento que recibe la señal proveniente del medio en forma de energía eléctrica y el cual pasa dicha información al transductor, que será el encargado de transducir esa energía en datos interpretables y cuantificables para el análisis de la respuesta; en los biosensores el receptor es el elemento biológico del sistema (Gordely VI, 2002). El elemento receptor de un biosensor puede ser muy variado y es esta versatilidad lo que ha propiciado la incursión de los biosensores en muy diversos campos de aplicación y explica el creciente interés en años recientes que ha presentado, la capacidad de usar enzimas, o materiales de actividad miméticas a enzimas en el desarrollo de biosensores más específicos y sensibles que los desarrollando en antaño (Ali *et al.*, 2017).

El primer intento formal por elaborar un biosensor se dio en el año de 1950 cuando Leland Clarck intentó desarrollar un dispositivo capaz de medir la reducción de oxígeno en sangre mediante un electrodo de platino relacionando la cantidad de oxígeno con la corriente mediada por el electrodo. Posterior a esta primera aproximación hacia la elaboración de biosensores, en 1962 Clarck y Lyons acoplaron al anterior sistema de Clarck una membrana semipermeable con la enzima glucosa oxidasa permitiendo determinar la concentración de glucosa en sangre creando de esta manera el primer biosensor propiamente dicho. Posterior a estos trabajos mencionado los elementos biológicos acoplados al transductor han sido sumamente variado propiciando una amplia gama de aplicaciones desde el sector médico para la detección de tumores o metabolitos en sangre hasta en la milicia para la detección de material biológico peligroso previniendo ataques de bioterrorismo (Ali *et al.*, 2017).

2.7 Clasificación de biosensores

No existe una clasificación establecida para los biosensores, más sin embargo de forma común se asocia su clasificación a dos factores, siendo el bioreceptor y el transductor los elementos tomados en cuenta para lograr la clasificación (Ali *et al.*, 2017).

2.7.1 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor

Son diversos los elementos biológicos empleados en los biosensores, entre ellos podemos encontrar enzimas, anticuerpos, proteínas, células completas y ácidos nucleicos a continuación el principio de cada elemento será descrito (Alhadrami *et al.*, 2018).

2.7.1.2 Biosensores enzimáticos

En este tipo de biosensores una enzima es empleada como bioreceptor siendo inmovilizada en la superficie del transductor. las ventajas de usar enzimas, como la alta especificidad de las interacciones enzima-sustrato, su principio de detección se basa en la presencia de ciertos analitos, midiendo cambios como: la concentración de protones (H^+), la liberación o absorción de gases (CO_2 , NH_3 , O_2 , etc.), emisión de luz, absorción o reflectancia o emisión de calor, que se produce durante el consumo del sustrato o la formación del producto de una reacción enzimática. El transductor luego convierte esos cambios en señales medibles (señales eléctricas, ópticas o térmicas) que se utilizan para identificar analitos de interés (Nguyen *et al.*, 2019).

2.7.1.3 Biosensores basados en proteínas receptoras

Esta clasificación se trata de los biosensores que basan su funcionamiento en proteínas no catalíticas y dependen de la capacidad de las proteínas de membrana celular para actuar como receptores. Estos receptores permiten la transducción de la señal de unión a través de la membrana ya sea por receptores metabotrópicos o por receptores ionotrópicos (Alhadrami *et al.*, 2018).

2.7.1.4 Biosensores basados en anticuerpos

También conocidos como inmunosensores, este tipo de sistemas son los más reportados en la actualidad dada la simpleza en los procesos de inmovilización y la versatilidad de su empleo. Como su nombre lo indica estos dispositivos basan su principio en la reacción antígeno-anticuerpo, son altamente empleados para detección de biomarcadores para padecimientos tales como cáncer, diabetes y enfermedades renales. Su aplicación no solo se limita al sector médico, sino también su incursión a nivel industrial se ha visto reflejado en años recientes mediante el uso para la detección de patógenos en alimentos o metabolitos secundarios de procesos fermentativos. El funcionamiento de estos sensores es similar al presentado por técnicas convencionales como ELISA y western blot, aunque de una forma miniaturizada, si perder sus propiedades sensitivas y específicas. El uso de transductores electroquímicos es empleado para estos sensores debido a ser capaces de

registrar la actividad eléctrica propiciada por la interacción entre el antígeno y el anticuerpo (Choi *et al.*, 2018).

2.7.1.5 Genosensores

Este tipo de biosensores basa su funcionamiento en el uso de aptámeros ya sea de DNA o RNA, estos dispositivos son usados como alternativas al uso de anticuerpos dada su estabilidad, especificidad y bajo costo. Los aptámeros son definidos como ácidos nucleicos (ssADN o ssARN) de una longitud cercana a los 100 nucleótidos. Los biosensores basados en aptámeros de ADN pueden unirse selectivamente con una especificidad y afinidad a bacterias, virus, proteínas, hormonas, etc. Los tipos de enlaces utilizados en esta unión son principalmente enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. El desarrollo de aptámeros permitió la fabricación de dispositivos biosensores innovadores con gran estabilidad y especificidad, menor costo y estrategias de detección mucho más simples en comparación con los inmunosensores (Aldrahi *et al.*, 2018).

2.7.1.6 Citosensores

Este tipo de biosensor por lo general se basa en técnicas microbiológicas y de ingeniería genética para aprovechar el uso de genes reporteros luminiscentes, estos biosensores pueden usar células procariontas o eucariotas para obtener información acerca de la composición química, toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de diversos compuestos de una forma rápida y sencilla. El desarrollo de citosensores de células no solo permite informar la presencia o ausencia del producto químico bajo investigación, sino también para medir con su concentración subletal, además, brindan información con alta especificidad sobre la fracción biodisponible de los elementos de interés (He *et al.*, 2018).

2.7.2 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor

Mediante la clase de elemento transductor que posean, los biosensores pueden ser clasificados en cuatro categorías como se describirán a continuación.

2.7.2.1 Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos basan su funcionamiento en elementos capaces de emitir una señal proporcional a la concentración del analito de interés. La resonancia de plasmón de superficie (SPR), la fluorescencia de onda evanescente y la interferometría de guía de onda óptica utilizan el campo evanescente cerca de la superficie del biosensor para detectar la interacción del elemento de bioreconocimiento con el analito. Existen dos clases principales de biosensores ópticos: en el uso sin etiqueta de marcaje la señal detectada se genera directamente por la interacción del material analizado con el transductor. En contraste, la detección basada en etiquetas implica el uso de un elemento capaz de emitir una señal óptica mediante un método colorimétrico, fluorescente o luminiscente (Damborský *et al.*, 2017).

2.7.2.2 Biosensores termométricos

Los biosensores termométricos son capaces de medir la absorción o la emisión de calor reflejado como una variación de temperatura dentro del medio de análisis. Estos dispositivos permiten la cuantificación de eventos catalíticos entre enzima y sustrato mediante diversos enfoques como la termometría o colorimetría. En estos sensores el total de la absorción o emisión calórica es proporcional a la entalpía del sistema y al número de moléculas formadas en reacciones bioquímicas por citar un ejemplo (Ramanathan and Danielsson, 2001).

2.7.2.3 Biosensores sensibles a masa

Este tipo de dispositivos ofrecen diversas ventajas por sobre otras tecnologías de biosensores, debido a su capacidad de operación en tiempo real y el monitoreo en entornos de líquidos, gaseosos o incluso al vacío. Sin embargo, la mayoría de estos biosensores se usan con menos frecuencia debido al empleo de materiales piezoeléctricos como transductores de señal, por lo tanto, la sensibilidad tiende a ser menor que en técnicas como resonancia de plasmón superficial.

Los biosensores de microcantilever son ejemplos de biosensores sensibles a la masa. Las principales características de los biosensores microcantilever son sus límites de detección inferiores en comparación con los métodos clásicos y sus dimensiones minúsculas (menos

de 10^{-3} mm²), lo que significa que se requiere una cantidad mínima de ambos receptores y analito para el ensayo (Alhadrami *et al.*, 2018).

2.7.2.4. Biosensores electroquímicos

Entre la gama de biosensores existentes los electroquímicos presentan el mayor número de trabajos reportados para su uso en diversos ámbitos, esto debido a cualidad como ser sencillos de operar, económicos, sensibles, portátiles y simples de construir (Zhu *et al.*, 2014). La aparición de sistemas miniaturizadas capaces de fungir como potenciostatos, aunado a la aparición de los SPEs con tintas y materiales con capacidades electroquímicas prometedoras aumentaron el número de grupos de investigación avocados en desarrollar biosensores electroquímicos capaces de solventar problemas sociales de una forma sencilla y de bajo costo, sin perder la capacidad de ser altamente sensibles y específicos. Como lo indica su nombre el principio de estos biosensores se basa en que el elemento transductor es capaz de convertir una señal electroquímica en el medio, la cual por lo general es el paso de electrones, en una señal cuantificable. De acuerdo con el principio de detección que los biosensores electroquímicos empleen pueden ser subclasificados en cuatro categorías: amperométricos, potenciométricos, conductimétricos y voltamétricos.

2.7.2.4.1 Biosensores amperométricos

La señal de estos biosensores se produce por un intercambio de electrones entre el componente biológico y el electrodo. Los biosensores amperométricos funcionan mediante la producción de una corriente cuando se aplica un potencial entre dos electrodos y el analito experimenta, o participa en, una reacción redox que puede seguirse midiendo la corriente en una celda electroquímica. El analito que se mide o la biomolécula involucrada con él cambia su estado de oxidación en el electrodo. La señal de transferencia de electrones se mide y es proporcional a la cantidad de especies activas en el electrodo redox. La técnica electroquímica típica que se realiza cuando se trabaja con biosensores amperométricos es la cronoamperometría, en la cual la corriente se mide en función del tiempo, cuando se aplica un potencial constante adecuado (Sadeghi, 2013).

2.7.2.4.2 Biosensores potenciométricos

Los biosensores potenciométricos generalmente dependen de una reacción bioquímica que conduce a una especie química más simple y su posterior detección electroquímica. En sensores potenciométricos, la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y el electrodo indicador se mide, con un voltímetro de muy alta impedancia, en condiciones de flujo de corriente casi nula. El electrodo de referencia proporciona un potencial constante contra el cual el potencial del electrodo indicador varía dependiendo de la actividad de un ion en la muestra a analizar (Yunus *et al.*, 2013).

2.7.2.4.3 Biosensores conductimétricos

Se trata de la categoría menos común de biosensores, reportados por lo general como herramientas de uso en cromatografías y como sensores químicos para la concentración de diversos gases. Los biosensores conductimétricos basan su fundamento en que por lo general las reacciones enzimáticas implican el consumo o la producción de especies químicas cargadas y por lo tanto conducen a un cambio en la composición iónica de la muestra analizada. Los biosensores conductimétricos tienen ventajas importantes, ya que no necesitan el uso de un electrodo de referencia, son insensibles a la luz; y se pueden miniaturizar e integrar fácilmente utilizando una tecnología de película delgada o serigrafado en los electrodos. Mas sin embargo se considera que los líquidos analizados tienen una conductividad de fondo que es significativa, que puede ser modificada fácilmente por diferentes factores, por lo que se presume que la selectividad de este método es baja y, por lo tanto, su uso potencial para diferentes aplicaciones no es completamente fehaciente (Jaffrezic-Renault and Dzyadevych, 2008).

2.7.2.4.4 Biosensores voltamétricos

Estos biosensores obtienen información del analito llevando a cabo una variación en el potencial y luego midiendo la corriente resultante. Es, por tanto, una técnica clasificada como voltamperométrica. Dado que hay diversas maneras de aplicar una variación en el potencial, también hay muchas formas de voltametría, tales como: polarografía, barrido lineal, escalera diferencial, pulso normal, pulso inverso, pulso diferencial, entre otras. La técnica mayormente usada en este tipo de biosensores es la voltamperometría cíclica, útil

para obtener información sobre el potencial redox y las velocidades de reacción electroquímica de las soluciones de analito. La voltamperometría cíclica se basa en la aplicación de un barrido de potencial de una carga positiva a una negativa, una vez cumplido el rango del potencial, se realiza un barrido, pero ahora en sentido inverso, la corriente producida en este lapso es reportada y guarda relación con la concentración del analito que se está analizando (Touhami, 2014).

2.8 Biosensores para la detección de Cys C

El primer biosensor empleado para la detección de Cys C data del año 2002, pese a esfuerzos anteriores para detectar dicha proteína, pero sin cumplir con los parámetros para ser considerados como biosensores debido a la nula portabilidad del sistema y la considerable cantidad de tiempo necesaria para el análisis (Pergande and Jung, 1993). El grupo de trabajo de Nedelkov y colaboradores reportaron en 2002 un biosensor para la detección de Cys C basado en el uso de espectrometría de masas y resonancia de plasmón superficial (SPRI) tras la fijación de anticuerpos de captura para la detección de la proteína de interés. Para el año 2012, Bleher y colaboradores reportaron un biosensor para Cys C basado en espectroscopia de interferencia reflectométrica tras su inmovilización con anticuerpos sobre una matriz de vidrio logrando un rango de detección de entre 0.53 a 1.02 mg/L. Durante el mismo año el grupo de trabajo de Gorodkiewicz desarrollo un dispositivo capaz de inmovilizar y detectar Cys C mediante el uso de bromelina, quimiopapaína y ficina tras la formación de complejos enzima-inhibidor y analizado mediante el uso de SPRI, logrando un límite de detección de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en muestras de saliva, orina y suero. Un método de fluorescencia para la detección de Cys C fue reportado por Lin y colaboradores en 2013 basado en nanoclusters de oro como sondas fluorescentes estabilizados con albumina sérica bovina (BSA), que al ser degradada por papaína interrumpe fluorescencia, y al encontrarse Cys C en medio es capaz de restaurarse.

Para el año 2016, surgieron las primeras aproximaciones electroquímicas para el desarrollo de biosensores dirigidos a Cys C siendo el primero de Mi y colaboradores, el cual se basó entre la interacción de nanobodies y nanotubos de titanio, los cuales al interactuar con Cys C y bajo irradiación presentaba un aumento característico en la fotocorriente, siendo capaz de dar indicios de la presencia de la proteína incluso en concentraciones de picogramos.

A este reporte le siguió el trabajo de Yang en el mismo año, logrando desarrollar un sistema de conversión de proteica altamente basada en el desplazamiento de la cadena de ADN inducida por una inmunorreacción y por la exonucleasa T7 asistida por la amplificación enzimática cíclica de la proteína para la detección de Cys C. A pesar de lograr la detección de Cys C todos los procedimientos previamente mencionados requerían de procesos e instrumentos complejos para su desarrollo contraponiéndose con las necesidades que buscan solventar los biosensores, puesto que se buscan pruebas rápidas y que no requiera de personal altamente capacitado para su uso, sino que su empleo se lleve a cabo en campo. El primer trabajo que representó un esquema de detección sencillo fue presentado por Desai y colaboradores en 2018 tras desarrollar un sistema de detección de Cys C mediante la inmovilización de papaína en un electrodo de oro funcionalizada con nanotubos de carbono y analizado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica y voltamperometría de pulso diferencial, logrando una detección mínima de 0.58 ng/L en un tiempo de respuesta de 10 minutos. Como se ha revisado, son múltiples los trabajos reportados para la detección de Cys C, más sin embargo ninguno ha buscado relacionar los valores electroquímicos con estadios de CKD.

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes se ha convertido en una emergencia de salud pública en México, catalogada como una enfermedad metabólica crónica de intervención inmediata o prioritaria por parte de las autoridades del sector salud. Derivados de cuadros diabéticos los padecimientos renales, también llamados nefropatías conforman un grupo de cuadros patológicos con difícil diagnóstico en etapas tempranas, conllevando a una evolución de la enfermedad que redundará en la disminución severa de la actividad renal viendo limitada la esperanza y calidad de vida de los pacientes que presentan estos padecimientos.

Debido a las limitaciones que presentan las pruebas actuales para la detección de daño renal en etapas tempranas, así como la falta de marcadores de daño renal en etapas iniciales, el uso de la nanotecnología representa una herramienta de importancia para el desarrollo de un prototipo de biosensor basado en nanoconjugados nanopartículas de carbono y papaína capaz de detectar el biomarcador Cistatina C, una molécula que en años recientes ha recibido atención importante debido a que su concentración en suero y orina no se ve afectada por edad, sexo, dieta o masa muscular del paciente.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo del nanoconjugado nanopartícula de CNPs/Papaína integrado a un electrodo de carbono serigrafiado permite la detección de la proteína Cys C en muestras de suero humano.

5. OJETIVO GENERAL

Desarrollar el prototipo de un biosensor electroquímico portátil basado en el nanoconjugado CNPs/Papaína para la detección de la proteína Cys C.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar y caracterizar las CNPs y los nanoconjugados de CNPs/Papaína.
2. Desarrollar el prototipo de biosensor utilizando los nanoconjugados CNP/Papaína y el sistema SPCE como matriz portátil.
3. Analizar la efectividad del prototipo de biosensor para la detección de la proteína Cys C.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diagrama general

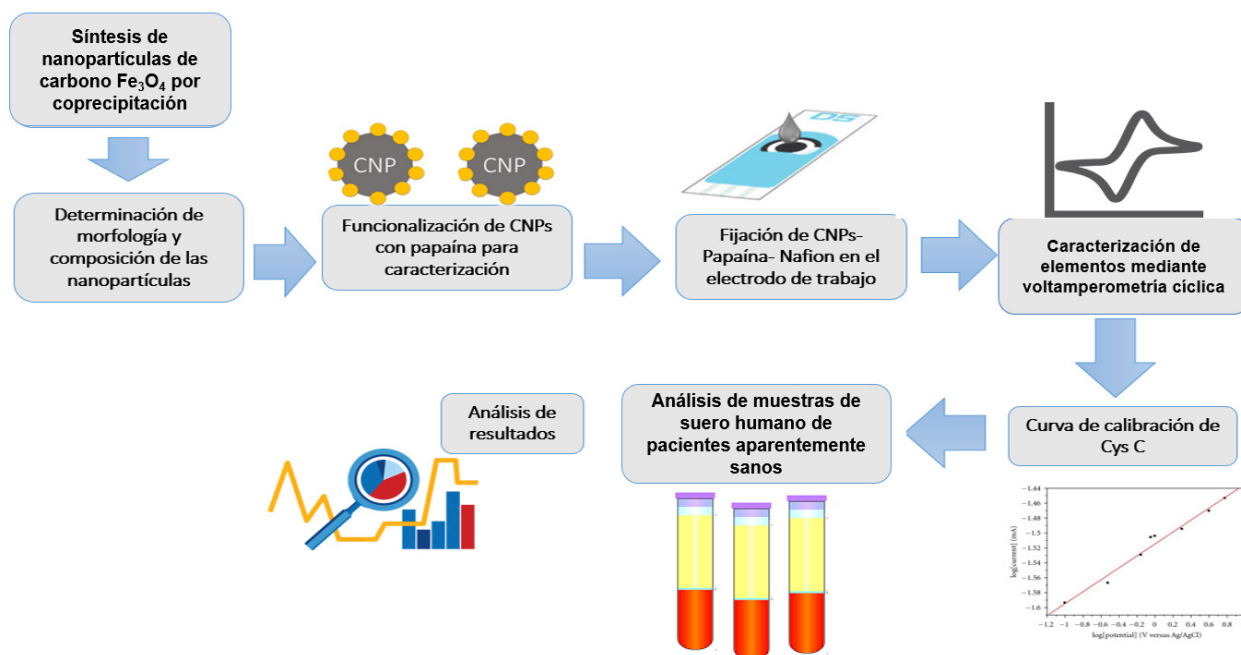


Figura 1. Diagrama experimental general del proyecto.

6.2 Síntesis de nanopartículas de carbono Fe₃O₄ por coprecipitación

En primera instancia, para la formación del núcleo magnético de las nanopartículas se siguió el método reportado por Bae y colaboradores en 2012. Se disolvieron 202.6 mg de FeSO₄·7H₂O y 546.1 mg de FeCl₃·6H₂O en 50 ml de ddH₂O, una vez disueltos, se agregaron mediante goteo 15 mL de NH₄OH (Productos Químicos Monterrey) y se incubó por 2 h bajo agitación magnética a 60 °C con un flujo continuo de nitrógeno. Una vez terminado el tiempo de reacción, se recuperaron los núcleos magnéticos mediante un campo magnético externo y se lavaron con ddH₂O, etanol y acetona de forma secuencial en un total de diez ciclos y se secaron durante 12 h a 25 °C. Tras el proceso de secado se dispersaron los núcleos magnéticos en una solución de quitosán al 0.5 M y se sonicaron durante 5 horas a 25 °C para obtener la cubierta de carbono.

6.2.1 Síntesis de nanopartículas multicore por coprecipitación

Para la adición de múltiples núcleos en las nanopartículas se siguió la metodología presentada en el apartado 6.2 agregando dos fases extra de incubación. Para la obtención de múltiples núcleos se disolvieron 202.6 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 546.1 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de ddH_2O , una vez clarificada la solución se agregaron 15 mL de NH_4OH mediante goteo y se incubó la solución durante 30 min en agitación magnética a 50 °C agregando un flujo continuo de nitrógeno. Para la etapa de maduración de la muestra, se sonicó la solución durante 1 h, para posteriormente incubarse a 80 °C por 1 h; terminada la etapa de incubación, los núcleos magnéticos se separaron usando un campo magnético externo para ser lavados con ddH_2O , etanol y acetona durante diez ciclos y se dejaron secar 12 h a 25 °C, finalmente los núcleos magnéticos fueron dispersados en una solución de quitosán al 0.5 M y se sonicaron durante 5 h a 25 °C para obtener la cubierta de carbono.

6.3 Preparación de los nananoconjugados CNPs/Papaína e inmovilización en el electrodo de trabajo

Se utilizaron 10 μL de CNPs en una concentración de 1 mg/mL las cuales se depositaron sobre la superficie del electrodo de trabajo del SPCE dejándolas incubar por 24 h a 25 °C. Una vez sobre la superficie del electrodo, se agregaron 10 μL de una solución volumen-volumen de EDC y NHS al 20 mM, dejando incubar la reacción por 24 horas a 25 °C. Posteriormente se depositaron 10 μL de papaína en una concentración de 10 mg/mL sobre el electrodo de trabajo, nuevamente incubando por 24 h a 4 °C, pasado el tiempo de incubación se agregaron 2 μL de Nafion al 5% sobre el electrodo de trabajo y se mantuvieron los electrodos a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.4 Detección de Cys C

La funcionalidad del sistema se midió mediante análisis de voltamperometría cíclica (CV) usando ferrocianuro de potasio como un indicador redox y con barridos de potencial de 0.7 a -0.45 V, con un rango de escaneo de 0.05 V/s utilizando el potenciostato 910PSTATmini (Metrohm). Se usaron diversas concentraciones de Cys C (0.9-3.0 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen de 10 μL , las cuales fueron incubadas durante 20 min a 25 °C sobre la superficie del electrodo de trabajo, el electrodo fue posteriormente lavado con agua Milli-Q

y secado a 25 °C. La detección de Cys C también se realizó retando el sistema ante suero humano extraído de tres pacientes sin registro de daño renal, para ello 1mL de sangre fue extraído mediante venopunción en tubos sin heparina para posteriormente ser centrifugados a 2000 G durante 5 min. Una vez obtenido el suero, éste fue analizado mediante el prototipo de biosensor sin la adición de Cys C y con posteriores adiciones de 0.9, 1.6 y 3.0 µg/mL del biomarcador.

6.5 Caracterización del biosensor

Características como morfología y composición de las CNPs y de los nanoconjugados fueron observados mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). El tamaño fue determinado usando el análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) y TEM. La formación de enlaces amida de los nanoconjugados se determinó mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) mediante Spectrum V5.31 en un rango de frecuencia 400–4000 cm⁻¹. La técnica de CV fue utilizada para analizar las cualidades conductimétricas de los diversos componentes del biosensor, así como para determinar la concentración de Cys C presente en las muestras.

7. RESULTADOS

Los primeros resultados obtenidos mediante el proceso de coprecipitación no demostró grandes cambios comparados con el proceso hidrotérmal, obteniendo en los primeros intentos tamaños de 1469 nm con PDI de 0.240, al ser sometidas a procesos de sonicación las nanopartículas presentaron un tamaño de 155.1 nm con PDI de 0.415 y al pasarlas por una etapa de filtrado mostraron diversas poblaciones que mediante DLS no pudieron determinarse de manera correcta (Figura 2).

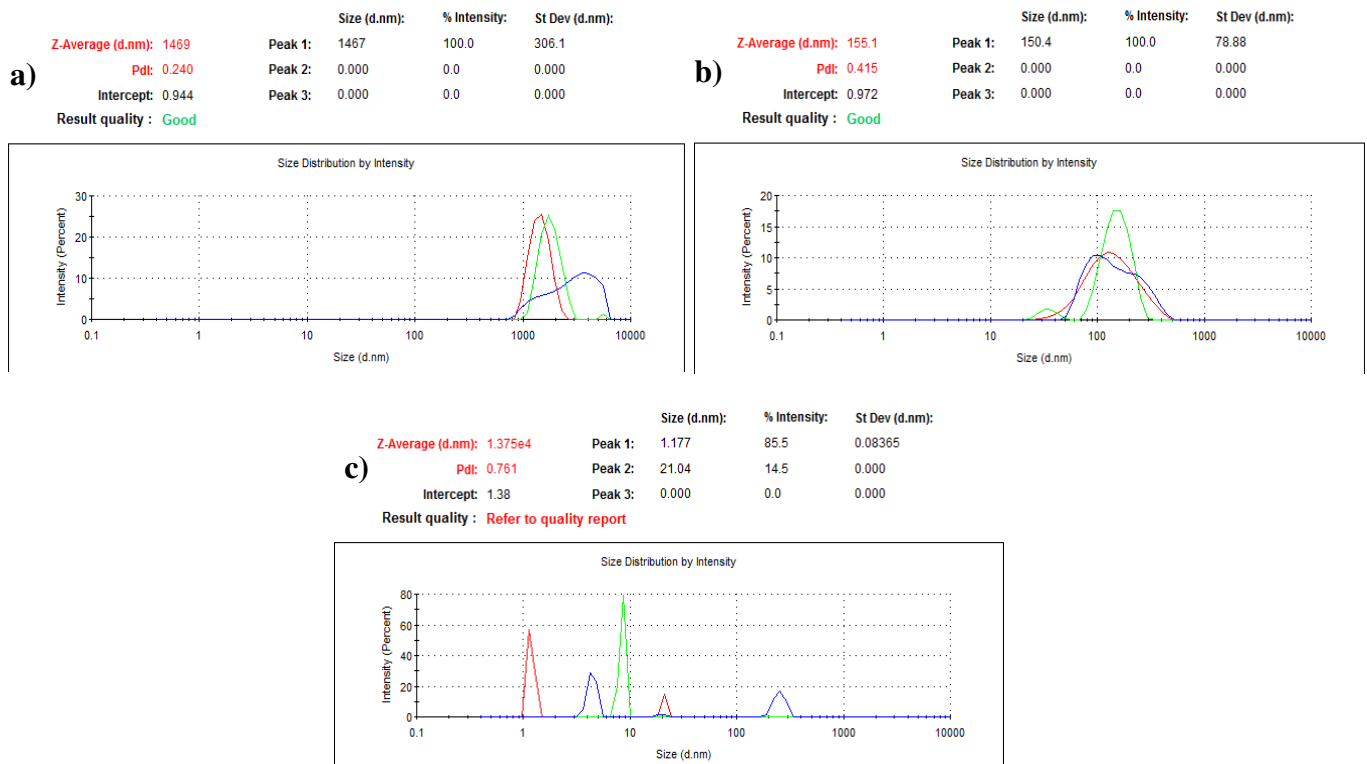


Figura 2. DLS de CNPs resuspendidas en H₂O MQ obtenidas a partir del método de síntesis por coprecipitación. a) DLS del material obtenido durante la síntesis. b) DLS del sobrenadante obtenido. c) Tamaño presentado por las nanopartículas tras ser filtradas.

Tras ajustes en la forma de administrar el hidróxido de amonio a la mezcla precursores magnéticos, se pudo establecer una forma de sintetizar magnetita con tamaño y características deseadas, obteniendo tamaños menores a los 200 nm como se muestra en la figura 3.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):	
a)	Z-Average (d.nm): 173.1	Peak 1: 204.4	96.6	99.80	Z-Average (d.nm): 150.8	Peak 1: 179.6	87.0	66.01
	Pdl: 0.259	Peak 2: 4725	3.4	768.8	Pdl: 0.440	Peak 2: 48.78	11.6	11.24
	Intercept: 0.963	Peak 3: 0.000	0.0	0.000	Intercept: 0.950	Peak 3: 5482	1.4	229.3
	Result quality : Good				Result quality : Good			

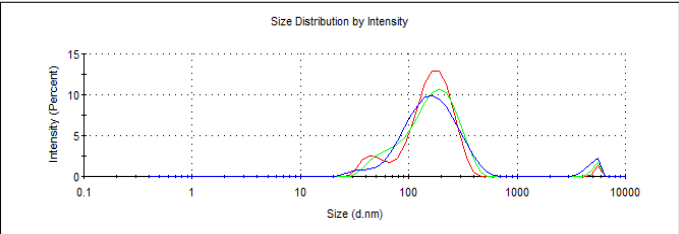
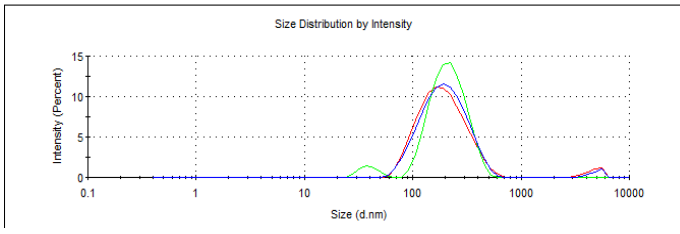


Figura 3. DLS CNPs resuspendidas en H₂O MQ obtenidas a partir del método de síntesis por coprecipitación. a) DLS de la magnetita obtenida durante la primera síntesis. b) DLS la magnetita obtenida tras la segunda síntesis.

Una vez obtenida la magnetita se buscó recubrirla con carbono, en primera instancia mediante procesos de sonicación en temperatura adicionando 2% y 3% de glucosa a la solución de magnetita (Figura 4) sin obtener resultados satisfactorios.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):	
a)	Z-Average (d.nm): 203.5	Peak 1: 228.9	97.5	97.15	Z-Average (d.nm): 170.1	Peak 1: 198.6	98.0	96.42
	Pdl: 0.217	Peak 2: 4871	2.5	687.8	Pdl: 0.216	Peak 2: 4901	2.0	671.0
	Intercept: 0.959	Peak 3: 0.000	0.0	0.000	Intercept: 0.958	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
	Result quality : Good				Result quality : Good			

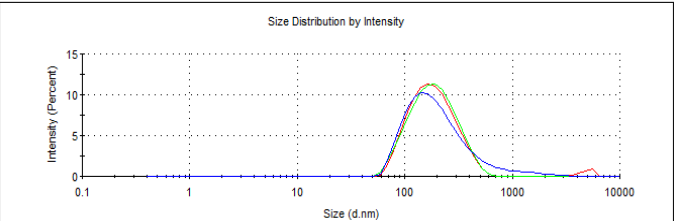
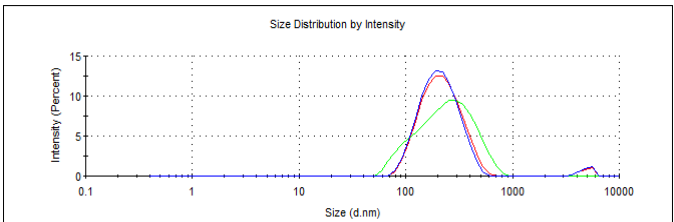


Figura 4. DLS de la magnetita sonicada con glucosa por 2 horas. a) DLS de la magnetita obtenida durante la adhesión de 2% de glucosa. b) DLS la magnetita obtenida tras la adhesión de 3% de glucosa.

Los resultados de los siguientes experimentos se presentan en la Tabla 1 con las condiciones y tiempos empleados para el recubrimiento de la magnetita.

Tabla 1. Ensayos para el recubrimiento de magnetita con carbono y su análisis mediante DLS.

Tratamiento	Muestra	Z-average (nm)	PDI	Calidad	Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 1	Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 2	Tamaño (nm) e intensidad de señal pico 3
Sin sonicación	Magnetita Stock	2137	0.338	Mala	3090 (92.1%)	311.1 (7.9%)	0 (0%)
	Magnetita	1899	0.786	Mala	4257 (74.5%)	426.3 (25.5%)	0 (0%)
Sonicación 1 hora	Magnetita Glucosa 1 M	396.7	0.567	Buena	208.5 (50.9%)	636.6 (46.4%)	5493 (2.7%)
	Magnetita Glucosa 2 M	111.9	0.305	Buena	122.1 (98.4%)	5399 (1.6%)	0 (0%)
	Magnetita Sin glucosa	136.5	0.239	Buena	146.8 (96.7%)	4997 (3.3%)	0 (0%)
Sonicación 2 horas	Magnetita Glucosa 1 M	445.5	0.650	Mala	346.6 (75.4%)	113.2 (24.6%)	0 (0%)
	Magnetita Glucosa 2 M	99.06	0.347	Buena	98.09 (98.6%)	5545 (1.4%)	0 (0%)
	Magnetita Sin glucosa	97.81	0.323	Buena	96.74 (97.9%)	5416 (2.1%)	0 (0%)
Sonicación 3 horas	Magnetita Glucosa 1 M	114.8	0.292	Buena	128.8 (98.1%)	5301 (1.9%)	0 (0%)
	Magnetita Glucosa 2 M	98.97	0.385	Buena	113.0 (98.1%)	5423 (1.9%)	0 (0%)
	Magnetita Sin glucosa	98.14	0.339	Buena	113.6 (95.2%)	4977 (4.8%)	0 (0%)
Sonicación 4 horas	Magnetita Glucosa 1 M	118.6	0.323	Buena	113.4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Magnetita Glucosa 2 M	101.0	0.375	Buena	110.2 (96.6%)	5301 (3.4%)	0 (0%)
	Magnetita Sin glucosa	99.31	0.339	Buena	100.5 (98.8%)	5560 (1.2%)	0 (0%)
Sonicación 5 horas	Magnetita Glucosa 1 M	113.8	0.364	Buena	114.4 (98.1%)	5406 (1.9%)	0 (0%)
	Magnetita Glucosa 2 M	100.8	0.398	Buena	111.2 (97.4%)	5373 (2.6%)	0 (0%)
	Magnetita Sin glucosa	96.78	0.374	Buena	103.9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Al no observar un crecimiento de forma constante en la magnetita dado su recubrimiento, ni una integridad de esta tras los procesos de sonicación, se cambiaron parámetros de la síntesis tales como la adición de un gas inerte, e inmediatamente llevadas a sonicación con glucosa en una relación 1:25 obteniendo nanopartículas de 109.5 y 119.3 nm con valores de PDI de 0.247 y 0.251 respectivamente (Figura 5).

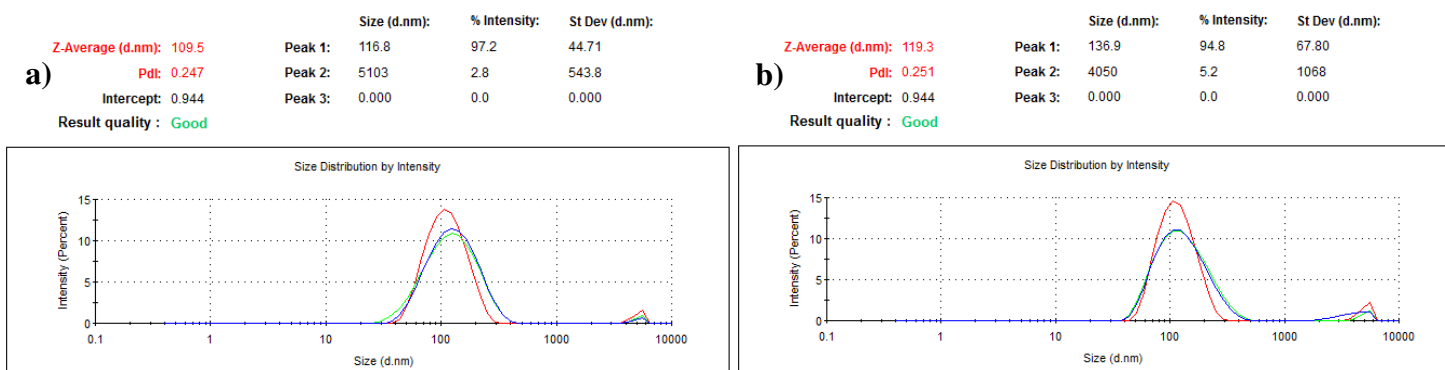


Figura 5. DLS de las CNPs sintetizadas en presencia de nitrógeno. a) Muestra 2. b) Muestra 4.

Por el menor tamaño encontrado en la muestra 2 se decidió seguir trabajando con dichas nanopartículas. El análisis de microscopía electrónica de transmisión arrojó un tamaño unitario de nanopartículas cercanas a los 10 nm y microscopía de fuerza atómica demostró una homogeneidad importante en las muestras (Figura 6).

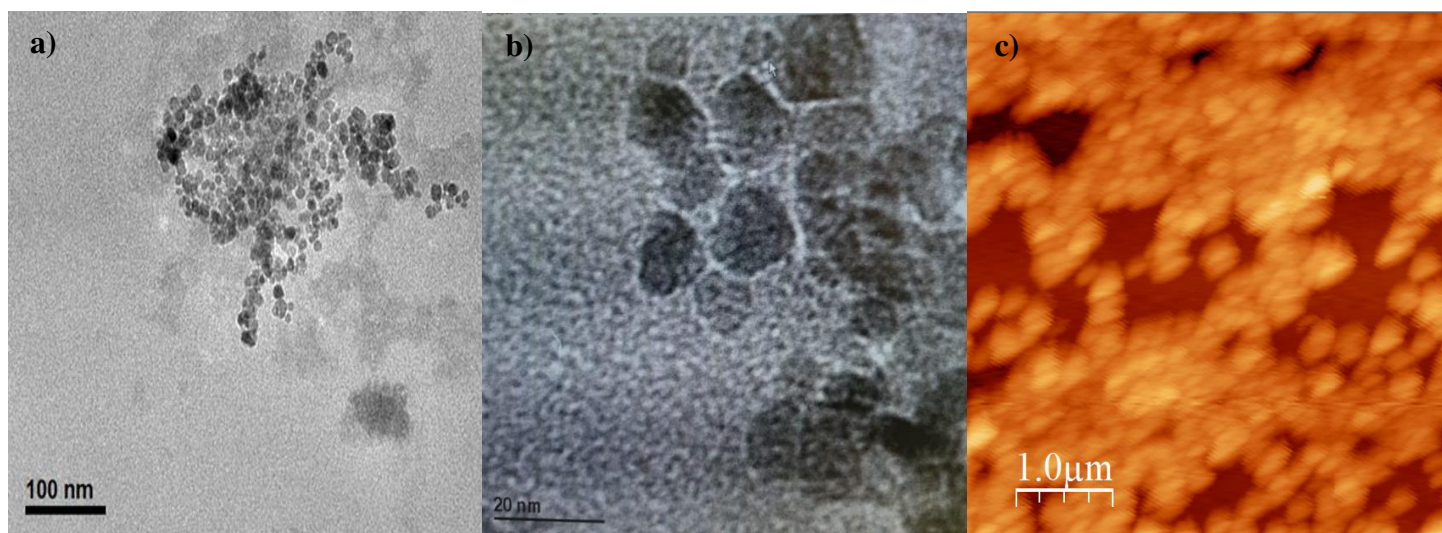


Figura 6. Caracterización de las CNPs. a) Microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas a escala de 100 nm. b) Microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas a escala de 20 nm c) Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas a escala de 1.0 μm.

La síntesis de nanopartículas multicore por coprecipitación permitió la obtención de nanopartículas con un tamaño cercano a 50 nm con una forma esférica con buena capacidad magnética, el método de síntesis permitió una buena dispersión de las nanopartículas y una homogeneidad en su geometría las cuales fueron corroboradas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 7 y 8).

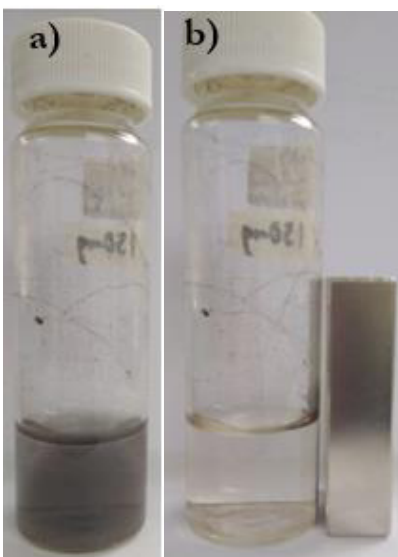


Figura 7. Determinación de la propiedad magnética de las CNPs multicore. a) suspensión de CNPs disueltas en ddH₂O, b) respuesta de las CNPs ante un campo magnético externo de 12,000 G.

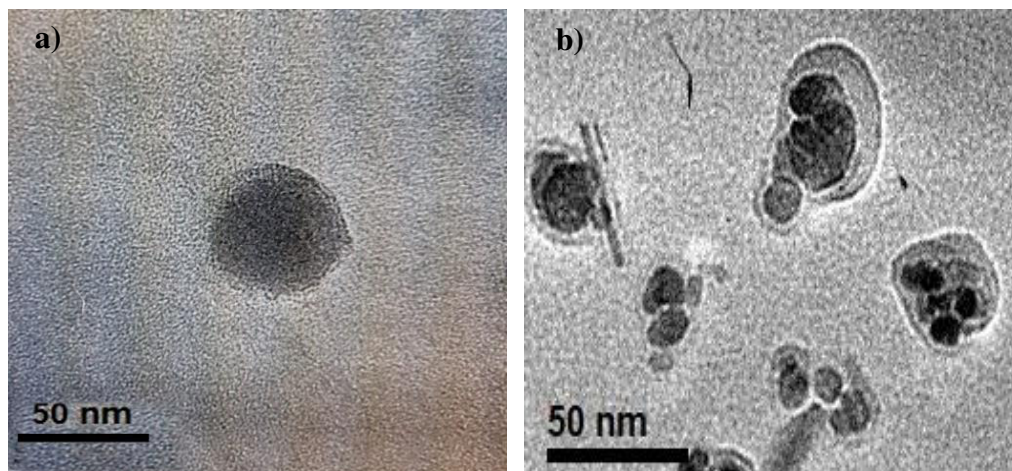


Figura 8. Microscopia electrónica de transmisión de CNPs multicore de óxido de hierro. a) y b) CNPs. Barra de escala= 50 nm.

Tras los resultados obtenidos en la figura 8, se llevó a cabo el análisis FTIR de las nanopartículas de carbono multicore, así como de los nanoconjugados derivados de estas, usando dimetilsulfóxido como solvente. La figura 9 muestra el análisis infrarrojo de las nanopartículas multicore de carbono, presentando el patrón de espectro esperado para ácidos carboxílicos a 3378 y 2962.

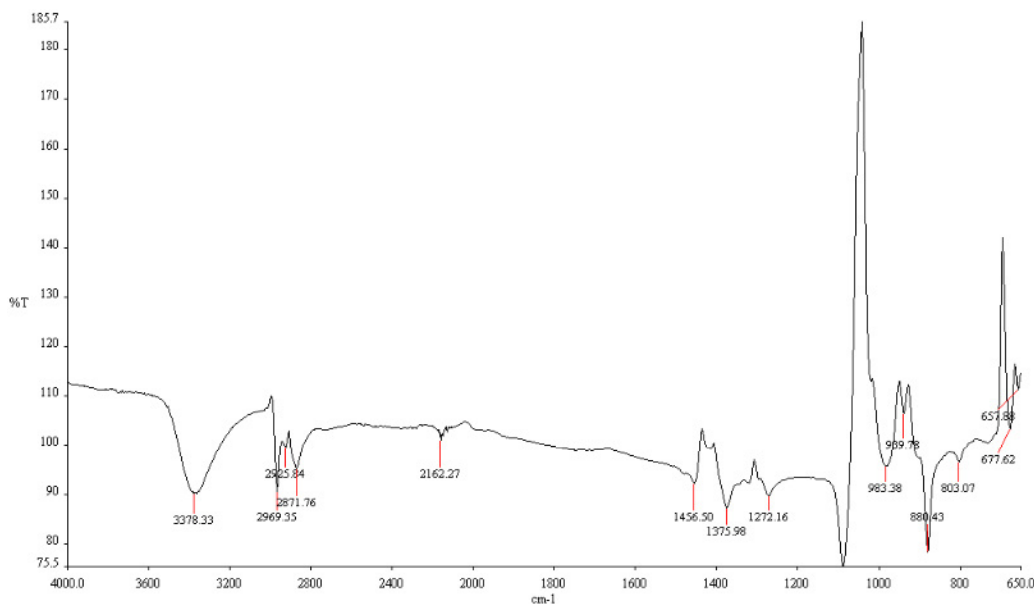


Figura 9. FTIR de las CNPs multicore. El pico de 3378 y 2962 representan la vibración de grupos carboxilo presentes en la superficie de la nanopartícula en el ordenamiento $O^{\circ}C - OH$ y $C - OH$.

En la figura 10, se observa un mayor pronunciamiento de los picos en 3378 y 2962 correspondientes a los grupos carboxilos, aunado a la aparición de un pico en 1654 proveniente de un enlace amida. La adición de la papaína a las nanopartículas funcionalizadas generó un mayor pronunciamiento de los picos mencionados con anterioridad.

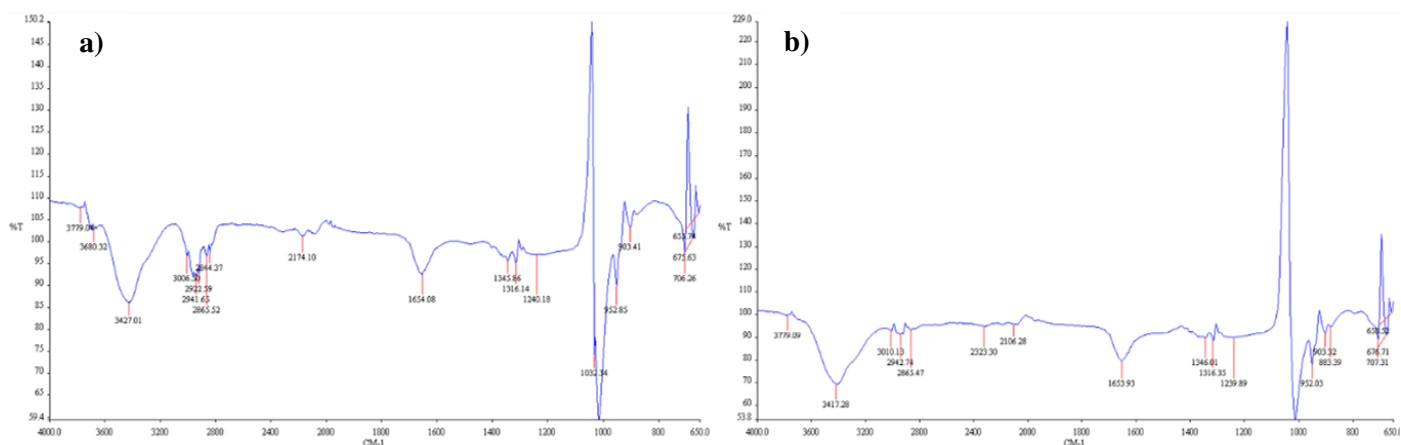


Figura 10. Caracterización de las CNPs y nanoconjugados. a) FTIR de nanopartículas de carbono multicore usando EDC NHS 10 mM. Los picos de 3427 y 2942 representan la vibración de grupos carboxilo presentes en la superficie de la nanopartícula en el ordenamiento, mientras $O^{\circ}C - OH$ y $C - OH$ mientras que en 1654 se representa un enlace amida. b) FTIR de los nanocomplejos nanopartículas de carbono-papaína. Los picos de 3417 y 2942 representan la vibración de grupos carboxilo presentes en la superficie de la nanopartícula en el

ordenamiento, mientras $O^=C - OH$ y $C - OH$ mientras que en 1653 se representa un enlace amida mayormente pronunciado por la conjugación entre CNPs y papaína.

La figura 11 muestra el contraste entre los espectros de infrarrojo obtenidos de las nanopartículas de carbono con respecto a los nanoconjugados observando una mayor pronunciación en los picos previamente mencionados.

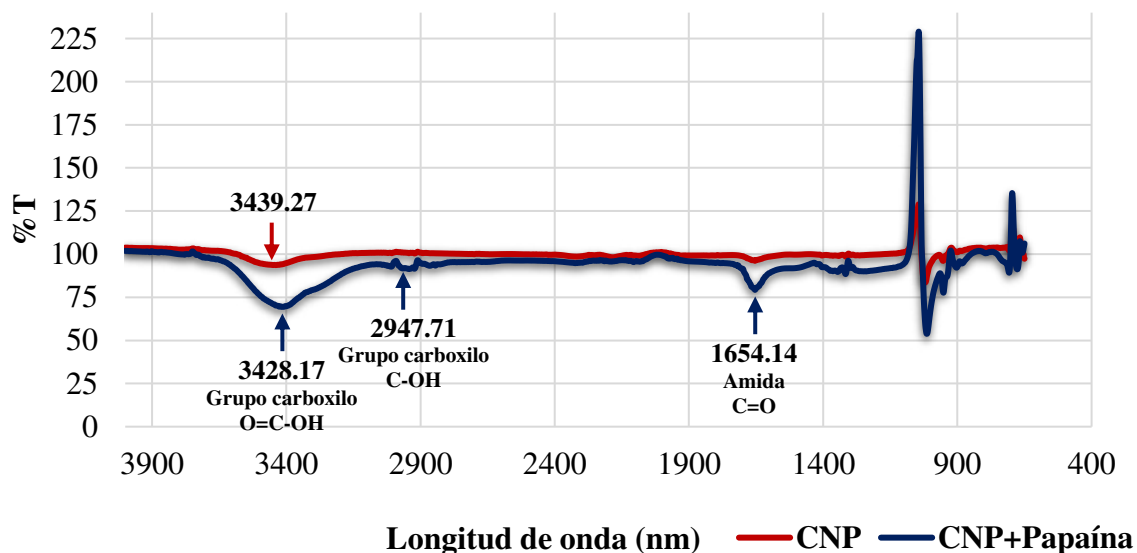


Figura 11. FTIR de los nanomateriales. Comparación de los espectros de infrarrojo por FTIR de las nanopartículas de carbono (rojo) y del nanocomplejo nanopartículas de carbono-papaína (azul). El pico cercano a 3400 corresponde a enlaces carboxilo mientras que en 1600 se muestra el enlace amida.

En la figura 12, se observa la metodología para el desarrollo del prototipo de biosensor, partiendo desde la funcionalización del electrodo SPCE hasta la descripción electroquímica del sistema mediante la técnica de voltamperometría cíclica utilizando el potencióstato 910PSTATmini.

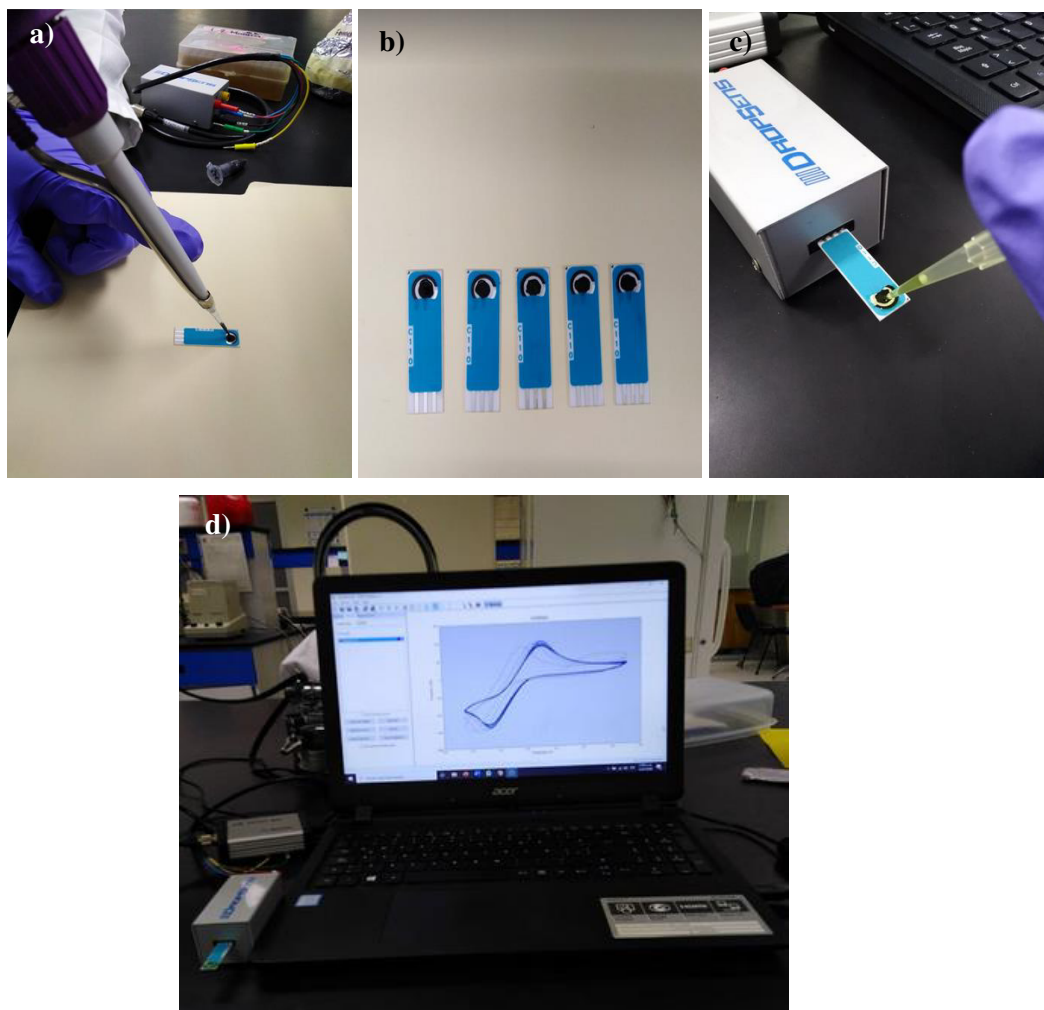


Figura 12. Representación del prototipo de biosensor. a) Funcionalización del electrodo de trabajo del SPCE con nanoconjugados y nafion. b) Electrodo funcionalizados con nanoconjugados y nafion. c) Depósito del electrolito ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6$, 10.0 mM). d) Análisis del prototipo de biosensor mediante CV utilizando el potenciostato 910PSTATmini.

Una vez obtenidas las nanopartículas con la morfología y composición deseadas y asegurando la conjugación con la papaína, se pasó a describir las cualidades conductimétricas que los elementos presentes en el sensor proveen al sistema. La figura 13 muestra los picos de óxido-reducción presentes en el sistema tras aplicar un barrido cíclico de potencial oscilante entre 0.7 y -0.45 V usando ferrocianuro de potasio como indicador redox, en un escaneo de 0.5 V/s. Cada medición del sistema se determinó analizar en el vigésimo ciclo de lectura al lograr la estabilidad del material. En primera instancia, se analizó el comportamiento del SPCE sin modificar obteniendo una intensidad de corriente (I) catódica

de 106.44 siendo tomado este valor como el estándar inicial o control del sistema. Al modificar el SPCE sólo con papaína en su superficie se obtuvo un valor de I de 37.45 mientras que al adicionar los CNPs sintetizadas el valor I aumento alcanzando un valor de 136.13 en la corriente catódica del sistema.

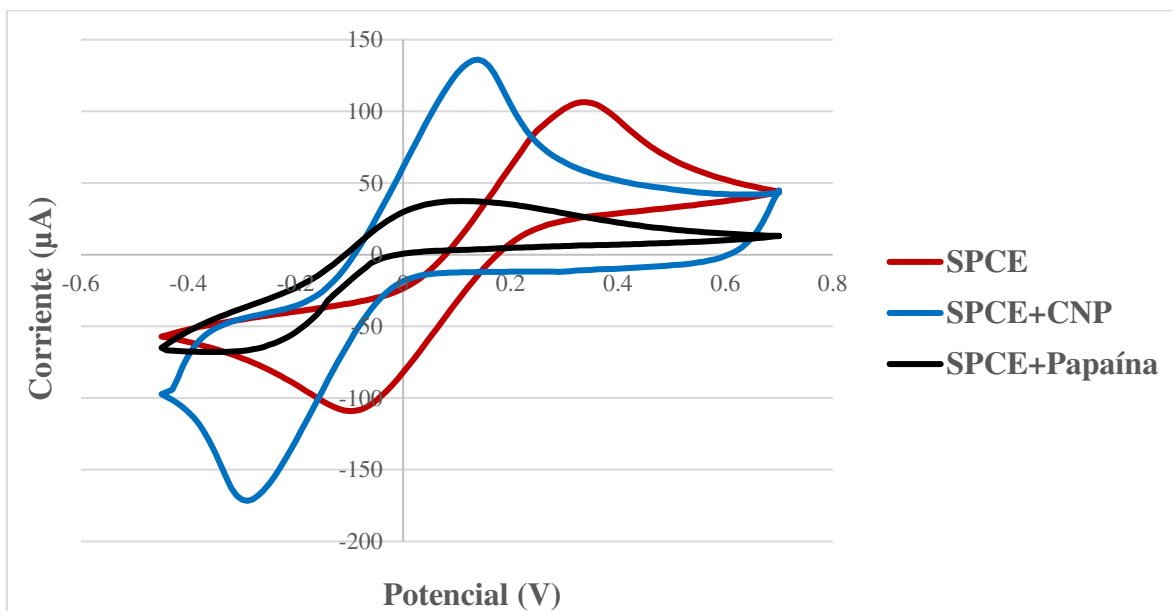


Figura 13. Voltamograma cíclico del dispositivo SPCE. SPCE sin modificar (rojo). SPCE funcionalizado con CNPs (azul). SPCE funcionalizado con papaína (negro). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10.0 mM).

Una vez determinada que la aplicación de las CNPs aumenta la conductividad del sistema se procedió a caracterizar la adhesión de cada elemento del sensor al SPCE. De nueva cuenta se determinó un aumento en el valor de la corriente resultante del sistema tras la aplicación de las CNPs al electrodo de trabajo ($I=136.13$) en comparación con el electrodo sin modificar ($I=106.44$), la adición de nuevos elementos tales como nanocomplejos fijados con nafion ($I=84.75$), aminoró la conductividad del sistema, reflejandose en la baja de la corriente catódica perteneciente a cada elemento, pero a su vez otorgando una estabilidad electroquímica reflejándose en la reproducibilidad del sistema (Figura 14 y 15).

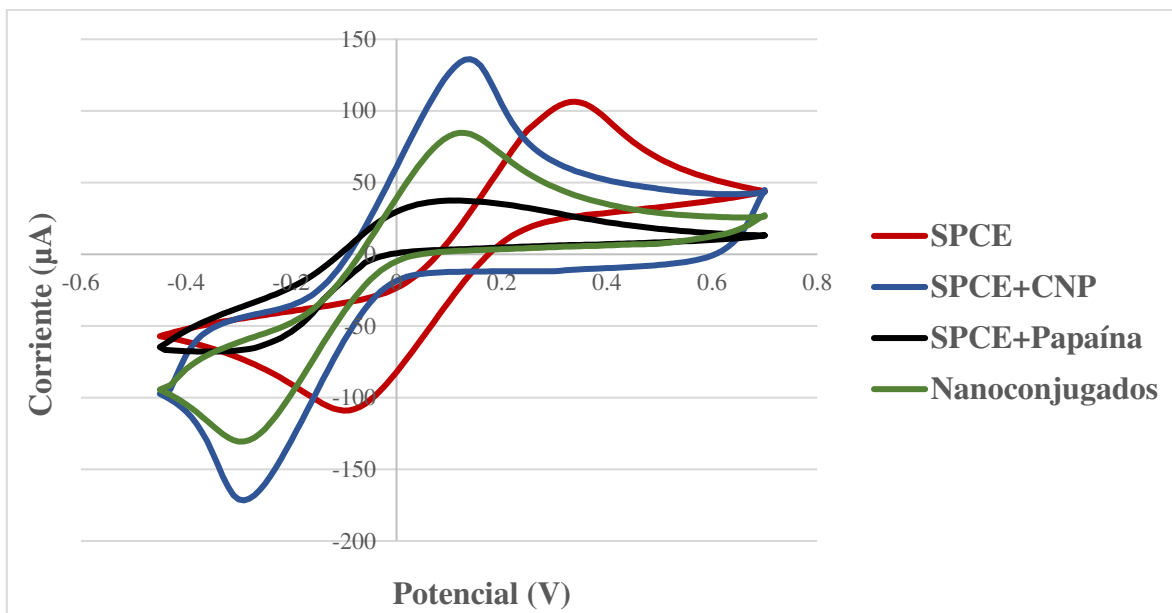


Figura 14. Caracterización electroquímica de los componentes del biosensor mediante voltamperometría cíclica. SPCE sin modificar (rojo). SPCE funcionalizado con CNPs (azul). SPCE con nanoconjugados (negro). SPCE funcionalizado con nanoconjugados y Nafion (verde). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM).

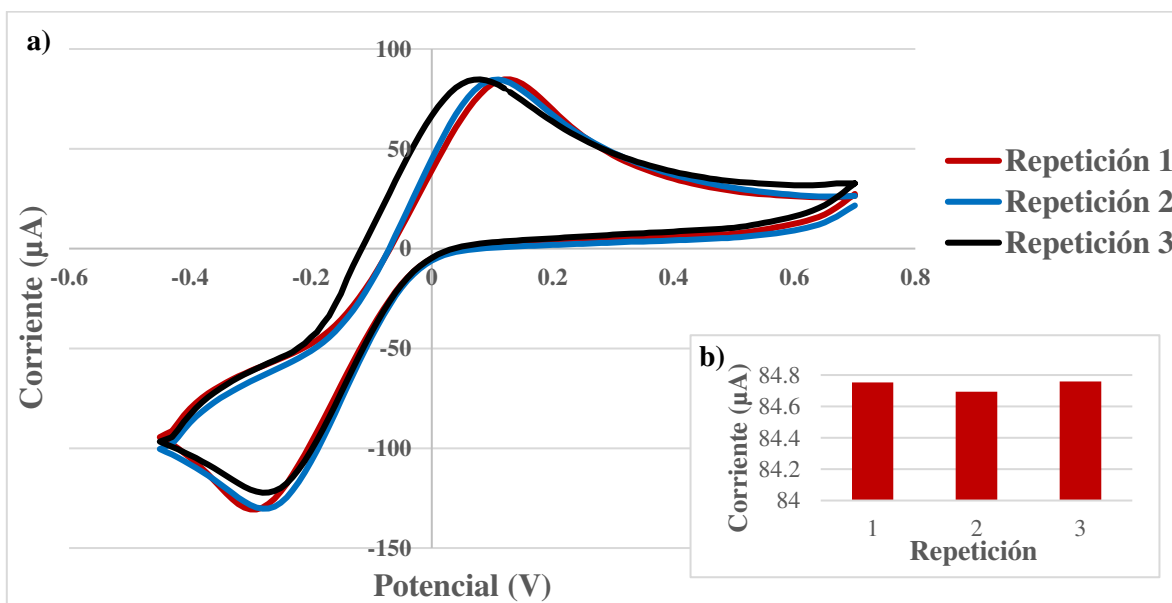
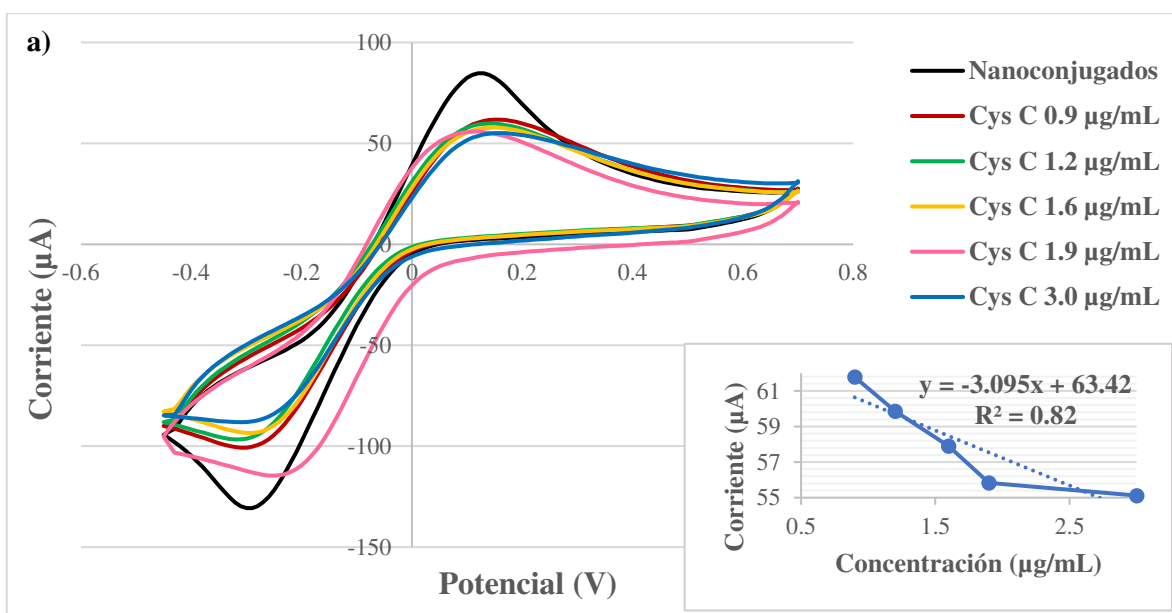


Figura 15. Caracterización electroquímica de la repetitividad del biosensor mediante voltamperometría cíclica. a) SPCE funcionalizado con nanoconjugados repetición 1 (rojo). SPCE funcionalizado con nanoconjugados repetición 2 (azul). SPCE funcionalizado con nanoconjugados repetición 3 (negro). b) Gráfica de la corriente resultante de las repeticiones realizadas con los dispositivos SPCE funcionalizados con

nanoconjugados. Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM).

Al ser capaces describir una correcta fijación de los elementos del biosensor mediante técnicas electroquímicas se procedió a realizar una curva de detección de la proteína Cys C en un rango de detección de 0.9 a 3.0 µg/mL correspondientes a los puntos de corte para clasificar las cinco etapas de la enfermedad renal crónica. Al igual que con la fijación de cada elemento del biosensor, la tendencia en el decrecimiento de la corriente resultante se mantuvo al adicionar la proteína Cys C al sensor de manera ascendente con respecto a su concentración, la corriente resultante se registró en un rango de 61.77 a 55.11 µA (Figura 16).



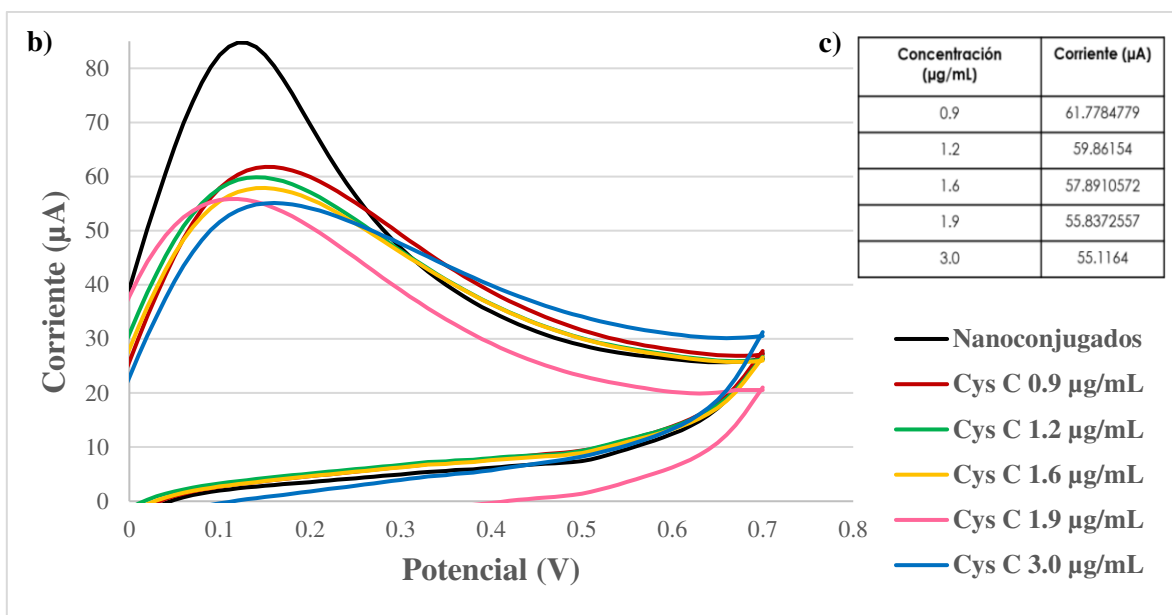


Figura 16. Obtención de la curva de detección de Cys C mediante voltamperometría cíclica. SPCE funcionalizado nanoconjugados (negro). Cys C a 0.9 µg/mL (rojo). Cys C a 1.2 µg/mL (verde). Cys C a 1.6 µg/mL (amarillo). Cys C a 1.9 µg/mL (rosa). Cys C a 3.0 µg/mL (azul). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Análisis de potencial en un rango de 0 a 0.8 V. c) Tabla de valores máximos obtenidos en la corriente catódica.

Tras obtener la curva de calibración de la proteína Cys C, se procedió a retar el sistema para la detección del biomarcador en muestras de suero proveniente de donadores sin antecedentes de daño renal diagnosticado, así como una posterior suplementación de dichos sueros con concentraciones de 0.9, 1.6 y 3.0 µg/mL de Cys C (Figuras 17-19). En el trio de muestras tanto naturales como fortificadas por el biomarcador la tendencia hacia la baja en los valores de corriente catódica se mantuvo, concordando a su vez con los rangos obtenidos durante la obtención de la curva de calibración mediante el uso de la proteína pura.

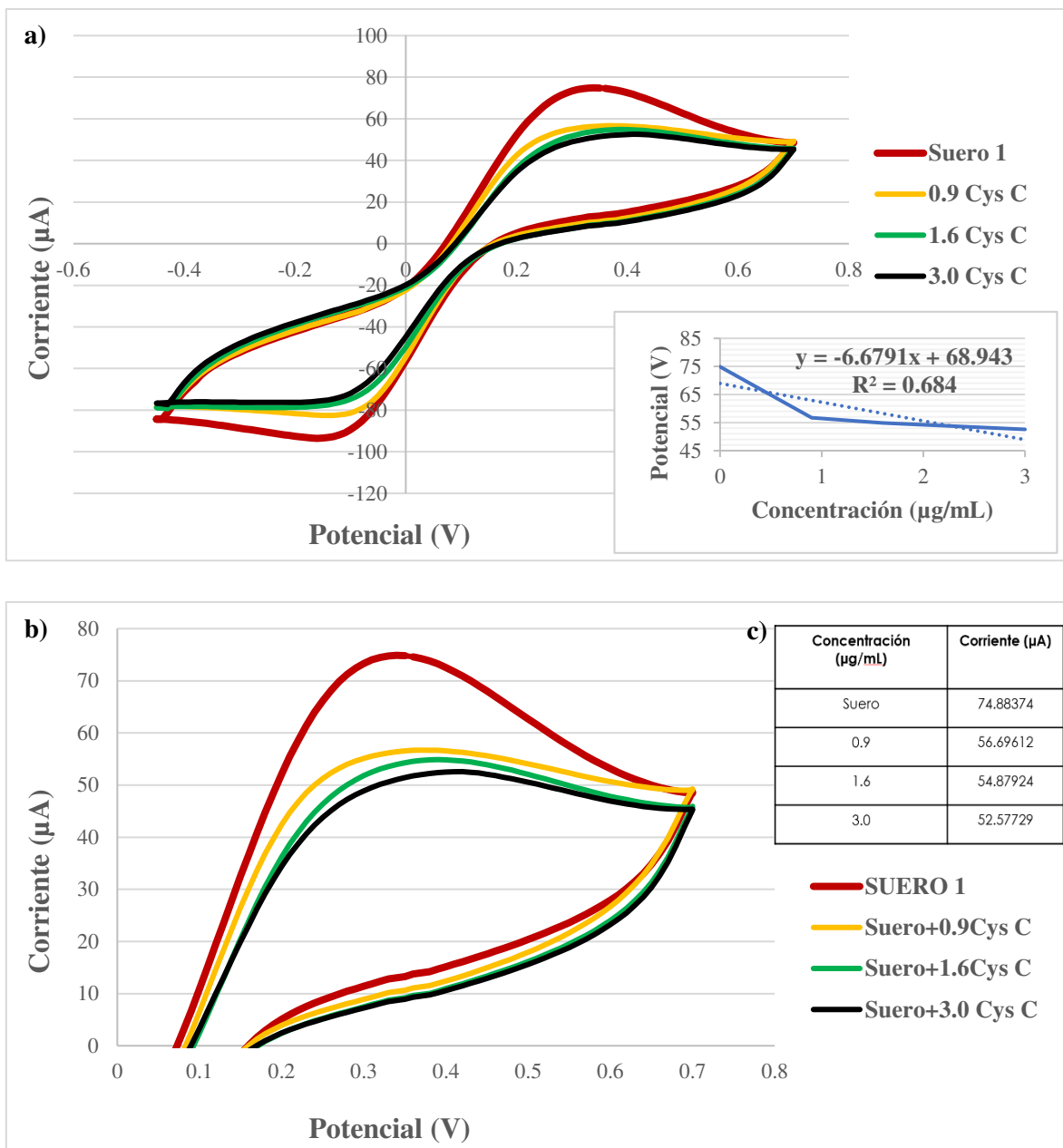


Figura 17. Análisis de suero del primer paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica. Muestra de suero del paciente (rojo). Muestra de suero con la adición de 0.9 µg/mL de Cys C (amarillo). Muestra de suero con la adición de 1.6 µg/mL de Cys C (verde). Muestra de suero con la adición de 3.0 µg/mL de Cys C (negro). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Análisis de potencial en un rango de 0 a 0.8 V. c) Tabla de valores máximos obtenidos en la corriente catódica.

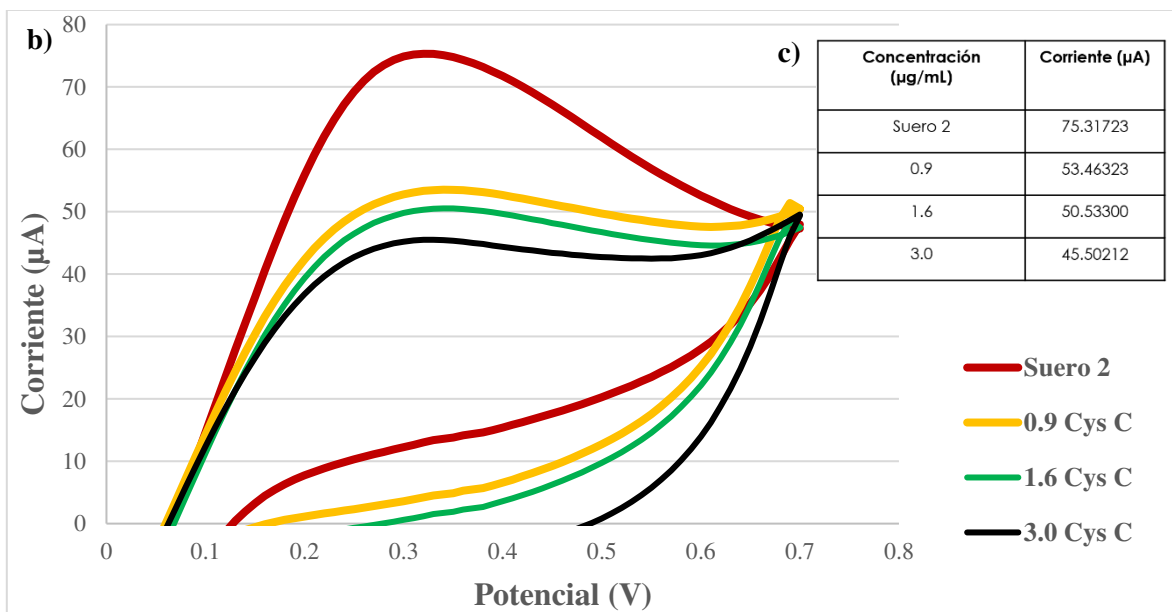
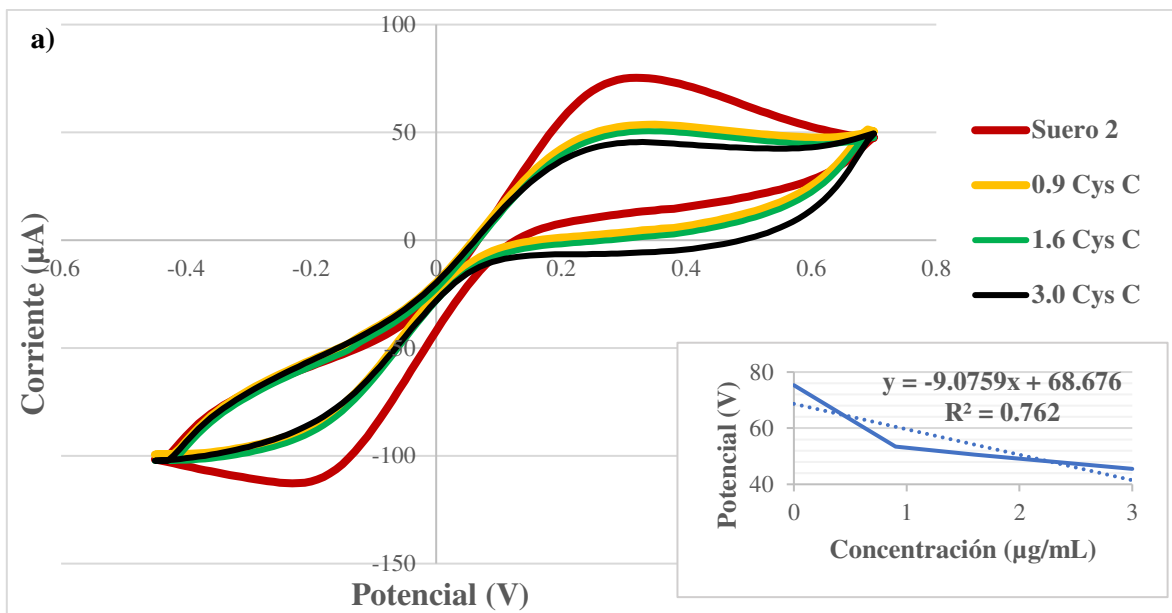


Figura 18. Análisis de suero del segundo paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica. Muestra de suero del paciente (rojo). Muestra de suero con la adición de 0.9 µg/mL de Cys C (amarillo). Muestra de suero con la adición de 1.6 µg/mL de Cys C (verde). Muestra de suero con la adición de 3.0 µg/mL de Cys C (negro). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (*vs* Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Análisis de potencial en un rango de 0 a 0.8 V. c) Tabla de valores máximos obtenidos en la corriente catódica.

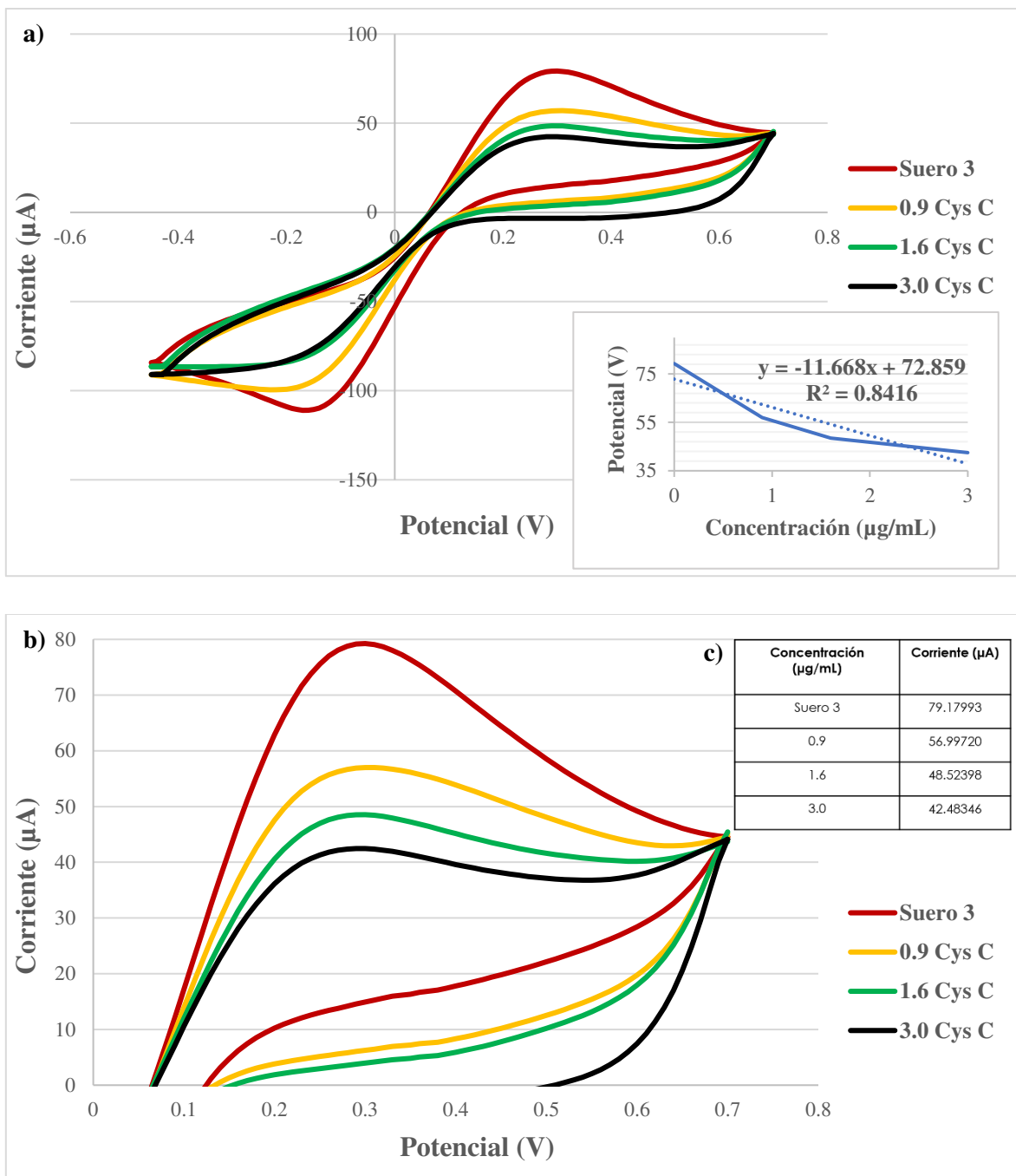


Figura 19. Análisis de suero del tercer paciente usando el prototipo de biosensor mediante voltamperometría cíclica. Muestra de suero del tercer paciente (rojo). Muestra de suero con la adición de 0.9 µg/mL de Cys C (amarillo). Muestra de suero con la adición de 1.6 µg/mL de Cys C (verde). Muestra de suero con la adición de 3.0 µg/mL de Cys C (negro). Rango de potencial de -0.45 V y 0.7 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50.0 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10.0 mM). b) Análisis de potencial en un rango de 0 a 0.8 V. c) Tabla de valores máximos obtenidos en la corriente catódica.

8. DISCUSIÓN

Tras la primer síntesis de nanopartículas por el método de coprecipitación se obtuvo material magnético por encima de la escala nanométrica, tal y como se presenta en la figura 2, dicho material tras ser filtrado y analizado de nueva cuenta mediante DLS arrojó múltiples poblaciones de residuos, esto debido a la poca integridad del material en cuestión. Ahn y colaboradores en 2012 reportó como la adición controlada del agente precipitante durante la reacción influye sobre las características morfológicas del material obtenido durante la síntesis de nanopartículas por métodos químicos, en nuestro trabajo se utilizó hidróxido de amonio como agente precipitante cuya función es donar iones hidroxilo para precipitar los hidróxidos metálicos pertenecientes a los precursores magnéticos empleados en la reacción, si el volumen de hidróxido de amonio se adiciona en grandes cantidades la precipitación de los materiales se ve aumentada, eliminando la posibilidad de su dispersión en el medio; dando como resultado la obtención de un material magnético de mayor tamaño al esperado. Una vez controlada la correcta adición del hidróxido de amonio el cual ahora se depositó sobre la reacción en razón de 400 μL por minuto se obtuvieron nanopartículas de un tamaño menor a la síntesis previa como lo muestra la figura 3; sin embargo la formación del recubrimiento de carbono no fue posible de realizar tal y como lo muestra la figura 4 y la Tabla 1, en donde se esperaba que al aumentar las concentraciones de la glucosa usada como fuente de carbono el tamaño de las nanopartículas obtenidas también se incrementará. Singh y colaboradores en el año 2018 reportaron una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de nitrógeno empleadas en los procesos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro mediante un método de coprecipitación con el tamaño y la estabilidad de las nanopartículas, asegurando que el nitrógeno se impregne a las nanopartículas ayudando a reducir su tamaño y en proteger los precipitados magnéticos, eliminando el oxígeno en el sistema de reacción, haciendo evidente la necesidad de un gas inerte durante la reacción de síntesis.

Como se muestra en la figura 5 un mayor control en la adición del hidróxido de amonio, aunado a la presencia de nitrógeno durante la reacción de síntesis permitió obtener nanopartículas con un menor tamaño al obtenido en síntesis anteriores y el análisis de DLS realizado posterior a los procesos de sonicación para la formación de la cubierta de carbono

arrojó poblaciones de tamaños similares a los obtenidos por Bae y colaboradores en el año 2012 con un tamaño de 100 nm y una estructura Core Shell óxido de hierro y carbono.

A pesar de Bae y colaboradores en 2012 reportaron la presencia de una cubierta de carbón amorfo en la superficie de la magnetita sintetizada, el análisis de TEM presentado en la figura 6 demuestra la ausencia de dicha cubierta en las nanopartículas obtenidas, así como un tamaño real de nanopartícula oscilante en los 10 nm, la discrepancia entre los tamaños de nanopartículas presentados por DLS y TEM pueden ser debido que al tener nanopartículas de óxido de hierro sin recubrir, la alta energía en su superficie favorece la aglomeración de este material y los procesos de sonicación permitió que los nano cristales presentes en la reacción formaran aglomerados homogéneos como se demuestra en la microscopia de AFM (Baratella *et al.*, 2013). Para asegurar la cubierta de carbono se optó por modificar el método de síntesis agregando una etapa de maduración de la muestra de nanopartículas con quitosán como fuente de carbono a 80 °C como proponen Gutiérrez y colaboradores en 2015, dando lugar a la formación de nanopartículas de carbono multicore con núcleos de óxido de hierro debido a la aglomeración controlada de estos núcleos y cuya capa de carbono superficial se muestra como carbón amorfo en la figura 8.

El análisis de FTIR de las CNPs multicore en la figura 9 confirmó la presencia de grupos carboxilos en la superficie de las nanopartículas, por lo tanto, se comprueba el recubrimiento de carbono presente en las nanopartículas. Cada tratamiento de CNPs ya sea sola o funcionalizada presentaron los patrones característicos de los ácidos carboxílico en el rango de 3400 y 2900 cm^{-1} . Como se muestra en las figuras 10 y 11, la adición de los agentes EDC y NHS permitió una mayor pronunciación de grupos carboxilos en la transmitancia de la prueba, razón por la cual se presume un incremento en el monto de grupos carboxilos disponibles para la unión de la papaína a la nanopartícula (Talkalar *et al.*, 2017). Tras la adición de los agentes activadores, así como al llevarse a cabo la conjugación de papaína se denota la presencia de un nuevo pico alrededor de los 1600 cm^{-1} correspondiente a la presencia del enlace amida entre grupos carboxilo de las CNPs y los aminos de la papaína (Desai *et al.*, 2018). Antes de la adición de la papaína se representa un enlace amida en las nanopartículas, esto puede ser debido al empleo de hidróxido de amonio en la síntesis de nanopartículas, en donde restos de este elemento presente en la muestra puede interactuar

con las CNP tras la activación de los grupos carboxilos por EDC y NHS, aunque cuando este fenómeno sucede la transmitancia relacionada al enlace amida es considerablemente menor con respecto a cuándo la papaína esta conjugada, debido a la mayor cantidad de enlaces formados tras la incursión de la papaína en la muestra de nanopartículas funcionalizadas (Forsythe *et al.*, 2015).

La comparación realizada en la figura 13 demuestra que la cubierta de carbono en las nanopartículas provee cualidades eléctricas importantes al demostrar un aumento del valor de I en los voltamogramas cíclicos, tanto en el SPCE sin modificar como con el SPCE modificado con papaína, resultando en una mejor estrategia conjugar las nanopartículas con la molécula de captura que utilizando solo esta última en el sistema para la detección del analito de interés. Los resultados obtenidos corresponden con lo descrito por Lai y colaboradores en 2017 donde describen un aumento en la conductividad de un sistema SPCE también empleado para detectar el virus de la encefalitis japonesa; la adición de CNPs al sistema propuesto por su grupo de trabajo demostró un aumento de la corriente catódica en comparación con el sistema sin modificar; al igual que en el grupo de Lai al conjugar un anticuerpo, en nuestro reporte se observa la baja de conductividad esperada debido a la adhesión de la papaína directamente depositada al electrodo de trabajo, influyendo en la capacidad del electrodo de mediar el paso de electrones.

La justificación del uso de CNPs conjugadas con papaína encuentra un impulso adicional en el trabajo de Nor y colaboradores en 2017 determinando el aumento en la efectividad de un biosensor de glucosa mediada por una mayor superficie de contacto en las nanopartículas y evitando modificaciones estructurales de las proteínas de captura depositadas sobre el electrodo de trabajo, lo cual puede redundar en una baja sensibilidad del biosensor, este fenómeno no se presentó en el desarrollo de este trabajo, como se demuestra en la figura 14 la corriente catódica del sistema completo no decreció de manera importante, registrando una corriente catódica de 83.9 μA , situación que no sea ha reflejado en trabajos previos de biosensores para Cys C, junto a esta situación el uso de Nafion para evitar la pérdida de los elementos depositados sobre el electrodo de trabajo no ha sido explorada en los trabajos anteriores de biosensores específicos para Cys C, pese a ser una matriz no conductiva el sistema demostró su robustez electroquímica al no perder de forma importante

la conductividad tras la adhesión de este agente, aunado a desempeñar un papel en la estabilidad electroquímica del sistema reflejándose en una alta reproducibilidad de los electrodos (Lin *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2016; Nor NM *et al.*, 2017 Desai *et al.*, 2018).

En la figura 14 puede observarse una tendencia a la baja en la conductividad del sistema al ir adicionando cada elemento del biosensor, corroborando de esta forma un correcto acoplamiento de los elementos, más sin embargo es evidente una segunda tendencia de desplazamiento en los potenciales de oxidación, dicho desplazamiento es debido a la adhesión de la papaína, esta molécula al ser de origen orgánico presenta una mayor facilidad de ser oxidada o reducida, alterando de esta forma el potencial presentado (Desai *et al.*, 2018).

En la figura 16 puede observarse la misma tendencia en el decrecimiento de la corriente catódica al aumentar la concentración de la proteína Cys C a detectar; este fenómeno es debido a la concentración de electrones dirigidos a la reacción entre papaína y Cys C, los cuales ya no estarán disponibles para las reacciones de óxido reducción indicadoras del ferrocianuro de potasio (Bhatnagar *et al.*, 2017; Desai *et al.*, 2018). Cada medición realizada de las concentraciones de Cys C corresponden a un estadio de daño renal yendo de etapa 1 a la 5, el sistema del biosensor fue capaz de discrepar entre cada etapa de daño renal mediante las variaciones de la corriente catódica resultantes de las mediciones.

Tras realizar la curva de calibración para la detección de la proteína Cys C se procedió a detectar el biomarcador en muestras de suero humano provenientes de tres donadores sin antecedentes de daño renal diagnosticado. Las corrientes máximas obtenidas para estos sueros tras su análisis fueron entre 74.8 y 79.17 μA que contrastado con el valor de concentración 0.9 que obtuvo un registro de 61.77 μA los tres donadores de suero no presentan una concentración de Cys C correspondiente a daño renal, pero los tres valores obtenidos se encuentran por debajo del valor 84.7 correspondiente al nanoconjugado sin el biomarcador, por lo cual las variaciones obtenidas del suero sin suplementar son debido a la concentración endógena de Cys C que los donadores poseen y que a su vez recaen en el rango de normalidad. Continuando con el reto del sistema ante muestras de suero, la adición de 0.9, 1.6 y 3.0 $\mu\text{g/mL}$ representó una tendencia a la baja en los valores pertenecientes a los picos de corriente catódica obtenidos por el sistema, este fenómeno es debido a que como se explicó con anterioridad, una mayor concentración de Cys C interaccionando con la papaína

presente en el sistema se interpone en los procesos de óxido-reducción a los que se somete el ferrocianuro de potasio por las variaciones en el potencial eléctrico aplicado, dirigiéndose parte de los electrones en el medio hacia la reacción Papaína-Cys C formando de esta manera una capa de difusión entre el electrodo de trabajo y el medio electrolito que funge como indicador redox. Las discrepancias en las señales obtenidas referentes a los valores de 0.9, 1.6 y 3.0 $\mu\text{g/mL}$ de Cys C provenientes de la curva de calibración y del suero suplementado también son debido a las concentraciones endógenas de Cys C que los donadores poseen. (Flodin *et al.*, 2007; Bargnoux *et al.*, 2017; Desai *et al.*, 2018). Un tercer fenómeno que se presentó tras el análisis de los sueros adicionados con Cys C es que la variación de μA entre cada uno de los rangos analizados para cada paciente varió con respecto al de la curva de calibración, con respecto a este suceso no se pudo encontrar literatura en donde se justifique su aparición, y con el ensayo de repetibilidad del sistema se descarta una variación generada por la preparación de los electrodos; se sugiere que dicha variabilidad es debido al factor humano durante algún punto de la adición de Cys C al suero y su posterior depósito en electrodo de trabajo.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró la síntesis y caracterización de las CNPs multicore obtenidas mediante coprecipitación química y de los nanoconjugados CNPs/Papaína.
2. Se logró cumplir con el desarrollo del prototipo de biosensor basado en los nanoconjugados CNP/Papaína usando el sistema SPCE como matriz portátil.
3. Se logró analizar la efectividad de biosensor para la detección electroquímica de la proteína Cys C mediante la obtención de una curva de calibración, así como mediante su detección en muestras de suero de donadores sin antecedentes de daño renal diagnosticado.

10. PERSPECTIVAS

La validación del sistema propuesto debe realizarse aumentando el número de muestras e incluyendo pacientes previamente diagnosticados con daño renal en diferentes estadios de evolución, así como contrastar la respuesta del biosensor con las técnicas estándar empleadas para la detección de Cys C. El presente trabajo de investigación se limitó a retar el sistema utilizando suero humano como medio de detección, en trabajos posteriores puede llevarse a cabo las adecuaciones necesarias del sistema para la detección del biomarcador en muestras de diferente naturaleza tales como saliva u orina.

El diseño del biosensor muestra la versatilidad necesaria para ser empleado en la detección de otras moléculas de interés o biomarcadores mediante análisis electroquímicos permitiendo una detección más práctica y sin representar un procedimiento invasivo para el paciente.

11. REFERENCIAS

- Abdul-Ghani M, DeFronzo RA, Del Prato S, Chilton R, Singh R, Ryder RE. 2017. Cardiovascular disease and type 2 diabetes: has the dawn of a new era arrived? *Diabetes Care*, 40(7), 813-820.
- Ahmed DS, Haider AJ, Mohammad MR. 2013. Comparison of functionalization of multi-walled carbon nanotubes treated by oil olive and nitric acid and their characterization. *Energy Procedia*, 36, 1111-1118.
- Ahn T, Kim JH, Yang HM, Lee JW, Kim JD. 2012. Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. *The journal of physical chemistry C*, 116(10), 6069-6076.
- Åkerblom A, Helmersson-Karlqvist J, Flodin M, Larsson A. 2015. Comparison between Cystatin C-and Creatinine-Estimated Glomerular Filtration Rate in Cardiology Patients. *Cardiorenal medicine*, 5(4), 289-296.
- Ali J, Najeeb J, Ali MA, Aslam MF, Raza A. 2017. Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. *J Biosens Bioelectron*, 8(1).
- Alhadrami HA. 2018. Biosensors: classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), 497-508.
- Alhadrami HA, Chinnappan R, Eissa S, Rahamn AA, Zourob M. 2017. High affinity truncated DNA aptamers for the development of fluorescence-based progesterone biosensors. *Analytical biochemistry*, 525, 78-84.
- Bae H, Ahmad T, Rhee I, Chang Y, Jin SU, Hong S. 2012. Carbon-coated iron oxide nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging. *Nanoscale research letters*, 7(1), 44.
- Baratella D, Magro M, Sinigaglia G, Zboril R, Salviulo G, Vianello F. 2013. A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 45, 13-18.

- Bagnoux AS, Piéroni L, Cristol JP, Kuster N, Delanaye P, Carlier MC, Delatour V. 2017. Multicenter evaluation of cystatin C measurement after assay standardization. *Clinical chemistry*, 63(4), 833-841.
- Barrett AJ. 1981. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol.* 80: 771–8.
- Bhatnagar D, Kaur I, Kumar A. 2017. Ultrasensitive cardiac troponin I antibody based nanohybrid sensor for rapid detection of human heart attack. *International journal of biological macromolecules*, 95, 505-510.
- Bongiovanni C, Magrini L, Salerno G, Gori CS, Cardelli P, Hur M. 2015. Serum Cystatin C for the Diagnosis of Acute Kidney Injury in Patients Admitted in the Emergency Department. *Dis Markers*. 2015;2015:416059.
- Bleher O, Ehni M, Gauglitz G. 2012. Label-free quantification of cystatin C as an improved marker for renal failure. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 349-356.
- Brzin J, Kopitar M, Vito Turk, Machleidt W. 1983. Protein inhibitors of cysteine proteinases. I. Isolation and characterization of stefin, a cytosolic protein inhibitor of cysteine proteinases from human polymorphonuclear granulocytes. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 364(2), 1475-1480.
- Chin SF, Lim LS, Pang SC, Sum MSH, Perera D. 2017. Carbon nanoparticle modified screen printed carbon electrode as a disposable electrochemical immunosensor strip for the detection of Japanese encephalitis virus. *Microchimica Acta*, 184(2), 491-497.
- Cho IH, Lee J, Kim J, Kang MS, Paik J, Ku S, Kim DH. 2018. Current technologies of electrochemical immunosensors: perspective on signal amplification. *Sensors*, 18(1), 207.
- Cisneros-González N, Ascencio-Montiel IJ, Libreros-Bango VN, Rodríguez-Vázquez H, Campos-Hernández Á, Dávila-Torres J, Kumate-Rodríguez J, Borja-Aburto VH. Índice

de amputaciones de extremidades inferiores en pacientes con diabetes. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2016Jul-Aug;54(4):472-9.

Covarrubias T, Delgado I, Rojas D, Coria M. 2017. Tamizaje en el diagnóstico y prevalencia de retinopatía diabética en atención primaria. *Revista médica de Chile*, 145(5), 564-571.

Damborský P, Švitel J, Katrlík J. 2016. Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91-100.

Desai D, Kumar A, Bose D, Datta M. 2018. Ultrasensitive sensor for detection of early stage chronic kidney disease in human. *Biosensors and Bioelectronics*, 105, 90-94.

De Silva PMCS, Mohammed Abdul KS, Eakanayake EM, Jayasinghe SS, Jayasumana C, Asanthi HB, Perera HS, Chaminda GG, Chandana EP, Siribaddana SH. 2016. Urinary biomarkers KIM-1 and NGAL for detection of chronic kidney disease of uncertain etiology (CKDu) among agricultural communities in Sri Lanka. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004979.

Deneke B, Gräber S, Schäfer C, Helss A, Wöltje M, Jahnke-Dechent W. 2003. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J*; 376: 135–45.

Ding L, Du D, Zhang X, Ju H. 2008. Trends in cell-based electrochemical biosensors. *Current medicinal chemistry*, 15(30), 3160-3170.

Du H, Chen R, Du J, Fan J, Peng X. 2016. Gold nanoparticle-based colorimetric recognition of creatinine with good selectivity and sensitivity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(48), 12334-12340.

Encarnación Cruz LM. 2016. Asumiendo el control de la diabetes. México. Fundación Mídete. pp. 3, Disponible en http://oment.uanl.mx/wpcontent/uploads/2016/11/FMidete_Asumiendo-Controle-Diabetes-2016.pdf Acceso 9 de julio del 2018.

Esnard F, Esnard A, Faucher D, Capony JP, Derancourt J, Brillard M, Gauthier F. 1990. Rat cystatin C. The complete amino acid sequence reveals a site for N-glycosylation. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 371: 161–6.

Faraji AH, Wipf P. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(8), 2950–2962.

Federación Internacional de Diabetes (IDF). 2012. Diabetes Atlas. Disponible en <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es>. Accesado el 9 de julio del 2018.

Federación Internacional de Diabetes (IDF). 2015. Diabetes Atlas. Séptima edición. Disponible en https://www.fundaciondiabetes.org/upload/publicaciones_ficheros/95/IDF Atlas 2015 SP W B oct2016.pdf

Flodin M, Jonsson AS, Hansson LO, Danielsson LÅ, Larsson A. 2007. Evaluation of Gentian cystatin C reagent on Abbott Ci8200 and calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min/1.73 m² from the cystatin C values in mg/L. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 67(5), 560-567.

Finney H, Newman DJ, Price CP. 2000. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Annals of clinical biochemistry*, 37(1), 49-59.

Forsythe JG, Yu SS, Mamajanov I, Grover MA, Krishnamurthy R, Fernández FM, Hud NV. 2015. Ester-mediated amide bond formation driven by wet–dry cycles: A possible path to polypeptides on the prebiotic Earth. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(34), 9871-9875.

Freije JP, Balbin M, Abrahamson M, Velasco G, Dalboge H, Grubb A, Lopez-Otin C. 1993. Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the Escherichia coli expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. *J Biol Chem*; 268: 15737–44.

Gao Y, Wu Y, Di J. 2017. Colorimetric detection of glucose based on gold nanoparticles coupled with silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 207-212.

Grubb A, Nyman U, Björk J, Lindström V, Rippe B, Sterner G, Christensson A. 2005. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children. *Clinical chemistry*, 51(8), 1420-1431.

Gómez-Gaete C. 2014. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Revista Farmacologica de Chile*, 7(2), 7-16.

Gorodkiewicz E, Luszczyn J. 2011. Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) sensor for cystatin determination based on immobilized papain. *Protein and peptide letters*, 18(1), 23-29.

Gutiérrez L, Costo R, Grüttner C, Westphal F, Gehrke N, Heinke D, Morales MP. 2015. Synthesis methods to prepare single-and multi-core iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Dalton Transactions*, 44(7), 2943-2952.

Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. 2000. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood*; 96: 2206-14.

He W, Hu ZH, Yuan S, Zhong WH, Mei YZ, Dai CC. 2018. Bacterial Bioreporter-Based Mercury and Phenanthrene Assessment in Yangtze River Delta Soils of China. *Journal of environmental quality*.

Hong RY, Li JH, Li HZ, Ding J, Zheng Y, Wei DG. 2008. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles without inert gas protection used as precursors of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320(9), 1605-1614.

Hsieh WT, Fong D, Sloane BF, Golembieski W, Smith DI. 1991 Mapping of the gene for human cysteine proteinase inhibitor stefin A, STF1, to chromosome 3cen-q21. *Genomics*; 9:207–9.

Inzucchi S, Rosenstock J, Umpiérrez G. 2016. Neuropatía diabética. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 97(5), 36A-36A.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI. 2018a. Defunciones por diabetes mellitus por Entidad federativa de residencia habitual de la persona fallecida, grupo quincenal de edad, año y sexo, en <http://www.beta.inegi.org.mx/app/tabulados/pxweb/inicio.html?rxid=75ada3fe-1e52-41b3-bf27-4cda26e957a7and>

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8.

Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. 2008. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(4), 2569–2588.

James LA, Ogilvie DJ, Yamakawa K, Nakamura Y, Stirling CJ, Anand R. Walking, 1996. Cloning, and mapping with YACs in 3q27: Localization of five ESTs including three members of the cystatin gene family and identification of CpG islands. *Genomics*; 32: 425–30.

Kadara RO, Jenkinson N, Banks CE. 2009. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138(2), 556-562.

Kang X, Wang J, Wu H, Aksay IA, Liu J, Lin Y. 2009. Glucose oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 901-905.

Khaled E, Mohamed GG, Awad T. 2008. Disposal screen-printed carbon paste electrodes for the potentiometric titration of surfactants. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1), 74-80.

Kellermann J, Haupt H, Auerswald EA, Muller-Ester W. 1989. The arrangement of disulfide loops in human alpha 2-HS glycoprotein. Similarity to the disulfide bridge structures of cystatins and kininogens. *J Biol Chem*; 264: 14121–8.

Khan I, Saeed K, Khan I. 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.

Kopanja L, Kralj S, Zunic D, Loncar B, Tadic M. 2016. Core–shell superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) clusters: TEM micrograph analysis, particle design and shape analysis. *Ceramics International*, 42(9), 10976-10984.

Lai HC, Chin SF, Pang SC, Sum H, Sia M, Perera D. 2017. Carbon Nanoparticles Based Electrochemical Biosensor Strip for Detection of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Nanomaterials*, 2017.

Lin H, Li L, Lei C, Xu X, Nie Z, Guo M, Yao S. 2013. Immune-independent and label-free fluorescent assay for Cystatin C detection based on protein-stabilized Au nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 256-261.

Mason RW, Sol-Church K, Abrahamson M. 1998. Amino acid substitutions in the N-terminal segment of cystatin C create selective protein inhibitors of lysosomal cysteine proteinases. *Biochem J*; 330: 833–8.

Méndez-Durán A, Méndez-Bueno JF, Tapia-Yáñez T, Montes AM, Aguilar-Sánchez L. 2010. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7-11.

Mi L, Wang P, Yan J, Qian J, Lu J, Yu J, Liu S. 2016. A novel photoelectrochemical immunosensor by integration of nanobody and TiO₂ nanotubes for sensitive detection of serum cystatin C. *Analytica chimica acta*, 902, 107-114.

Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. 2007 Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol*, 22, 101–108.

Morales MM, Llanes OMA, Febles YU, Cedeño MF. 2018. Cistatina C: marcador de laboratorio precoz de enfermedad renal en pacientes con degranocitosis. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 34(2).

Mohamed HM. 2016. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 1-11.

Mussap M, Plebani M. 2004. Biochemistry and clinical role of human cystatin C. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 41(5-6), 467-550.

Nedelkov D, Tubbs KA, Nelson RW. 2002. Design of buffer exchange surfaces and sensor chips for biosensor chip mass spectrometry. *Proteomics*, 2(4), 441-446.

Nor NM, Razak KA, Lockman Z. 2017. Physical and electrochemical properties of iron oxide nanoparticles-modified electrode for amperometric glucose detection. *Electrochimica Acta*, 248, 160-168.

Nguyen H, Lee S, Lee U, Fermin C, Kim M. 2019. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.

Onopiuk A, Tokarzewicz A, Gorodkiewicz E. 2015. Cystatin C: a kidney function biomarker. In *Advances in clinical chemistry* (Vol. 68, pp. 57-69). Elsevier.

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Centro de prensa. Ginebra: OMS; 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> Acceso el 6 de Julio de 2018.

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Día Mundial de la Salud 2016: Diabetes perfiles de los países 2016. Ginebra: OMS; 2016. Disponible http://www.who.int/diabetes/country-profiles/mex_es.pdf?ua=1 Acceso el 6 de Julio de 2018.

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. ¿Qué es la diabetes? Ginebra: OMS; 2016. Disponible en http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html Acceso el 6 julio de 2018

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). 2016. Crecimiento de mortalidad por diabetes mellitus por cada 100 mil habitantes. Recuperado de <http://stats.oecd.org/#>. Accesado el 11 de julio del 2017.

Gutiérrez Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Hernández-Avila M. 2012. Encuesta nacional de salud y nutrición: Resultados nacionales. Tomado de <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>.

Pergande M, Jung K. 1993. Sandwich enzyme immunoassay of cystatin C in serum with commercially available antibodies. *Clinical chemistry*, 39(9), 1885-1890.

Ramanathan K, Danielsson B. 2001. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417-423.

Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. 2006. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), 1790–1798.

Rosas-Peralta M, Arizmendi-Uribe E, Borrayo-Sánchez G. 2017. ¿De qué fallecen los adultos en México? Impacto en el desarrollo económico y social de la nación. La carga global de los padecimientos cardiovasculares. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(1), 98-103.

Ruiz-Arenas R, Sierra-Amor R, Seccombe D, Raymondo S, Graziani MS, Panteghini M, Biljak VR. 2017. A summary of worldwide national activities in Chronic Kidney Disease (CKD) testing. *EJIFCC*, 28(4), 302.

Rysz J, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Jabłonowski Z, Ciałkowska-Rysz A. 2017. Novel biomarkers in the diagnosis of chronic kidney disease and the prediction of its outcome. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1702.

Sadeghi SJ. 2013. Amperometric biosensors. *Encyclopedia of Biophysics*, 61-67.

Säemann MD, Weichhart T, Hörl WH, Zlabinger GJ. 2005. Tamm–Horsfall protein: A multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Investig.* 35, 227–235.

- Sanvicens N, Marco MP. 2008. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 425–433.
- Sayanthooran S, Magana-Arachchi DN, Gunerathne L, Abeysekera T. 2017. Potential diagnostic biomarkers for chronic kidney disease of unknown etiology (CKD) in Sri Lanka: A pilot study. *BMC Nephrol*, 18, 31.
- Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ, Fried LF, Newman AB, Stehman-Breen C, Siscovick DS. 2006. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease. *Annals of internal medicine*, 145(4), 237-246.
- Singh S, Mahajan T, Kaur K. 2018. Synthesis, characterization and effect of increasing nitrogen concentration on the growth of ZnO nanoparticles. *Journal of Material Sciences*. 7(1). 141-151.
- Sittiwong J, Unob F. 2015. Detection of urinary creatinine using gold nanoparticles after solid phase extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138, 381-386.
- Takalkar S, Baryeh K, Liu G. 2017. Fluorescent carbon nanoparticle-based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 98, 147-154.
- Tao J, Zhao P, Zeng Q. 2016. The determination of cystatin C in serum based on label-free and near-infrared light emitted PbS@ BSA QDs. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(24), 4258-4262.
- Touhami A. 2014. Biosensors and nanobiosensors: design and applications. *Nanomedicine*, 15, 374-403.
- Wei H, Wang E. 2008. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2250-2254.
- Yang J, Blum A, Novak T, Levinson R, Lai E, Barasch J. 2002. An epithelial precursor is regulated by the ureteric bud and by the renal stroma. *Dev. Biol.*, 246, 296–310

Yang ZH, Zhuo Y, Yuan R, Chai YQ. 2016. Highly effective protein converting strategy for ultrasensitive electrochemical assay of Cystatin C. *Analytical chemistry*, 88(10), 5189-5196.

Yunus S, Jonas AM, Lakard B. 2013. *Potentiometric Biosensors. Encyclopedia of Biophysics, 1941–1946.*

Zeeuwen PL, Van Vlijmen-Willems IM, Jansen BJ, Sotiropoulou G, Curfs JH, Meis JF, Janssen JJ, Van Ruissen F, Schalkwijk J. 2001. Cystatin M/E expression is restricted to differentiated epidermal keratinocytes and sweat glands: A new skin-specific proteinase inhibitor that is a target for crosslinking by transglutaminase. *J Invest Dermatol*; 116: 693–701.

Zhu C, Yang G, Li H, Du D, Lin Y. 2014. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical chemistry*, 87(1), 230-249.