

BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN DIÓXIDO DE TITANIO SOPORTADO EN ÓXIDO DE GRAFENO Y GRAFITO PIROLÍTICO, SU MÉTODO DE FABRICACIÓN Y MÉTODO DE DETECCIÓN TEMPRANA DE CÉLULAS CANCEROSAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo técnico de los dispositivos nanoestructurados con capacidad de transducción de información biológica en señales eléctricas, en especial, con sensores electroquímicos para la detección temprana de enfermedades y su tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial [4], el cual, se distribuye por regiones. En América se tiene el 21% de nuevos casos, el 23,40 % en Europa, 57,3 % en Asia, 7,3 % en África, y el 1,40% en Oceanía

En la actualidad, existen más de 200 tipos de cáncer. Según National Cancer Institute [8], la tasa de mortalidad por cáncer es 40% más alta[4], La principal causa de muerte por cáncer varía considerablemente entre países, dependiendo del grado de desarrollo económico, los factores sociales y del estilo de vida[6].

Entre los cánceres de mayor incidencia se encuentra la leucemia[5], (aproximadamente 5.2 casos por 100.000 habitantes) [9]. En países de bajos y medianos ingresos se pronostica que alcance el 61% en 2050[10].

Según las proyecciones de Globocan, el cáncer de leucemia Mieloide Crónica (LMC) representa entre del 15 al 20% del total de las leucemias diagnosticadas [11]

Según el Registro Poblacional de Personas con cáncer en Colombia, la tasa de mortalidad reportada entre los años 2001 a 2015, fue de 3,6 en mujeres y 4,4 en hombres por cada 100000 habitantes[12].

Según el Registro Nacional de Tumores de Solca Quito en Ecuador entre el 2009 y el 2013, para niños de 0 a 19 años, el 4,15% de los casos de cáncer son leucemia mieloide crónica en ambos sexos [13]. La mayoría de pacientes son diagnosticados en la fase crónica y pueden ser asintomáticos[14], esta enfermedad normalmente es trifásica, con una fase crónica (LMC-FC), una acelerada (LMC-FA) y una blástica (LMC-FB)[15].

Otro componente del problema es el tiempo de resultados de las pruebas para la detección de leucemia, como el recuento manual de glóbulos blancos (WBC) y glóbulos rojos (RBC) por microscopía y otros como biometría hemática, aspirado de médula ósea, Análisis RT-PCR, inmune fenotipo y todos procesos lentos, tediosos y en ocasiones un tanto imprecisos [16], [17].

La accesibilidad a los centros médicos es un problema en los países con ingresos económicos medios y bajos, donde los altos precios de los medicamentos contra el cáncer[18], dificultan el manejo de la enfermedad.

- 10 El desarrollo de nuevos dispositivos nanoestructurados ha permitido a los investigadores desarrollar nuevos materiales que permitan las transducciones de información biológica en una señal eléctrica, desarrollando biosensores electroquímicos capaces de detectar enfermedades en etapas tempranas.

- 15 A su vez, es posible reconocer diferentes células de leucemia (es decir, células K562 / ADM y células K562 / BW), debido a su diferente comportamiento electroquímico y características hidrofílicas / hidrófobas en los electrodos modificados debido a los componentes específicos en las membranas plasmáticas de las células diana, permitiendo el desarrollo de biosensores biocompatibles y sensibles a múltiples señales para el diagnóstico temprano de cánceres.[23]

- 20 En el estado de la técnica se encuentran diferentes tipos de soluciones relacionadas con sensores electroquímicos para la detección de células cancerosas. En este contexto, Chen L. et. al, 2018 revela un biosensor basado en un transistor electroquímico orgánico (OECT) para la detección de la expresión de glucano en las células cancerosas vivas. El dispositivo muestra una respuesta a las células MCF-7 hasta 10 células/uL[24].

- 30 Kashefi- Kheyraadi, et al, (2014) describe un biosensor electroquímico exento de marcaje basado en aptámeros para la detección sensible de HepG2, esto es, una línea celular de carcinoma hepatocelular. Las células diana se capturan en una arquitectura de sándwich utilizando el aptámero TLS11a unido covalentemente a una superficie de oro y un aptámero TLS11a secundario. La aplicación del aptámero TLS11a como capa de reconocimiento dio como resultado un sensor con alta afinidad por las células cancerosas HepG2 en comparación con las células cancerosas de control de los tumores de próstata, mama y colon humanos[25]

- 35 Zanghelini et al, (2016) proponen un biosensor tridimensional utilizado en un dispositivo de punto de atención electroquímico. La plataforma bioconjugada se construye sobre una serie de enlaces covalentes entre las moléculas de lectina y una capa de cisteína inmovilizada sobre nanomembranas tridimensionales de tipo TiO2 recubiertas de oro.

He Y., et al, (2015) demostró un nuevo método electroquímico basado en el método target – inducida de un péptido específico para el análisis sensible del antígeno prostático específico (PSA) mediante el uso de plata. Primero, se agruparon nano híbridos de nanotubos de carbono / poli (amido amina) de paredes múltiples (MWCNTs – PAMAM) en el electrodo para unir el péptido. Posteriormente, se preparó (dithiobis[succinimidyl propionatel] (DSP) @ Au @ SiO₂ como una etiqueta de rastreo y un enlace covalente con los péptidos a través de la interacción inherente entre DSP y el amino del péptido. En presencia de PSA, el péptido se reconoció específicamente y se escindió, lo que resultó en la pérdida de la etiqueta de rastreo en la superficie del electrodo. Posteriormente, se realizó una mejora de la plata en los nano híbridos DSP @ Au @ SiO₂ de la izquierda.

En este contexto, resulta necesario desarrollar biosensores que permitan lograr la detección efectiva y temprana de células cancerosas.

El Grupo de investigación “Físico Química de Bio y Nanomateriales” (FIQ-Bionanomat) de la Universidad del Valle sintetizó un nanocompuesto modificado de TiO₂ -TiO₂-modificado- que, al combinarlo con radiación UV, fue capaz de generar citotoxicidad o muerte celular, del 98,6 % en líneas de cáncer de cuello uterino (HeLa) y del 90,5% en leucemia mieloide crónica (K-562), pero con mínimos y en algunos casos nulos efectos citotóxicos en células y líneas celulares no cancerígenas, línea celular CHO y células normales linfocitos sanos (Patente WO2016055869A1 – CO 14-225737).

El nanocompuesto de TiO₂-modificado, de acuerdo con lo revelado por la patente WO2016055869A1 – CO 14-225737 ha demostrando que es selectivo y efectivo frente a células cancerosas, sin causar genotoxicidad ni mutagenotoxicidad.

El estudio del TiO₂-modificado con células HeLa mostró resultados del transporte del nanomaterial en el transcurso de tiempo observando que a los 20 minutos el nanomaterial inicia su ingreso dentro de las células HeLa y en transcurso del tiempo la concentración del nanomaterial dentro de las células se incrementan, permitiendo ver detalles de cómo la membrana se deforma, observando que dentro del transcurso de los 20 minutos las células inician el proceso de endocitosis. A las 2 horas de interacción, las partículas se encuentran en el interior de las células dentro de vacuolas.

Tomando como base los elementos del estado de la técnica expuestos con anterioridad, la presente invención revela un dispositivo para la detección de células cancerosas, a partir de TiO₂-modificado, teniendo en consideración que este nanomaterial presenta la capacidad de adherir células cancerosas de forma selectiva en relación con las demás células, detectando de forma rápida dichas células, por medio de un diagnóstico electroquímico, en el cual los tiempos de la reacción electroquímica son generalmente muy cortos.

OBJETO DE LA INVENCION.

En un primer objeto, la presente invención revela un biosensor electroquímico con electrodo de GO/HPOG recubierto de TiO₂- modificado que detecta de forma
5 rápida, células cancerosas, en especial, células de leucemia mieloide crónica, donde el rango de detección se encuentra entre 6250 células/mL hasta 1'000.000 células/mL.

Las células cancerosas se adhieren a la superficie del sensor y, en mayor cantidad, a las partículas de TiO₂-modificado, y lo hacen formando pseudópodos o pies falsos
10 con la membrana celular que se sujeta al nanomaterial.

El biosensor permite detectar células cancerosas, en especial, células de leucemia mieloide crónica, a muy bajas concentraciones, o lo que es igual, en etapas o estadios muy tempranos de la enfermedad.

En la modalidad preferida de la invención, el biosensor se encuentra soportado
15 sobre grafito pirolítico 100% C, donde dicho HPOG se encuentra funcionalizado por tres ácidos fuertes, y recubierto de TiO₂-modificado, formando un circuito triangular con un electrodo de referencia y un contraelectrodo, con una velocidad de escaneo de 0,01V/s , una amplitud de (-0,2 V a 0,2V), variación de tiempo de 0,05 segundos, utilizando una Voltimetría de pulso diferencial, donde se generan señales de control
20 como respuesta a la señal de corriente eléctrica con una curva de calibración representada en una regresión lineal $y = 2 \times 10^{-5}x + 72,67$, con $R^2 = 98\%$.

En un objeto adicional, la presente invención divulga el método de fabricación del biosensor.

Los objetos anteriormente descritos, al igual que los objetos adicionales a que
25 hubiere lugar, serán expuestos al detalle y con la suficiencia necesaria en el capítulo descriptivo que se divulga a continuación, el cual constituirá el fundamento del capítulo reivindicatorio.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS.

30 FIGURA 1. Resultados de microscopia de fluorescencia.

FIGURA 2. Resultados de Microscopia electrónica de barrido SEM de adherencia de células K-562 sobre el biosensor de la invención.

FIGURA 3. Voltimetría cíclica del sensor de la invención. Muestra el comportamiento de las placas GO26, GO36, TGO260 y TGO360 Con medio Iscover sin células rango
35 de potencial (-0,4 a 1,4V) y una frecuencia de barrido de 0,020 V/S.

FIGURA 4. Voltimetría cíclica placas HOPG. PLACAS GO26, PLACA GO36, TGO260 Y TGO360 con 1×10^4 cell/ml, rango de potencial (-0,4 A 1,4V) y una frecuencia de barrido de 0,020 V/S.

FIGURA 5. Voltimetría cíclica del hopg a diferentes concentraciones de células/ml con un rango de potencial (-0,1893V - 0,9616 V), frecuencia de barrido de 0,010MV/S.

FIGURA 6. Comparación de las concentraciones de las células con los potenciales del sensor en la modalidad preferida de la invención.

FIGURA 7. Muestra la curva de calibración del sensor a diferentes concentraciones de células.

FIGURA 8. Muestra una célula cancerosa adherida a la superficie del sensor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención surge como respuesta a la necesidad de proveer soluciones nanotecnológicas para la detección temprana de cáncer.

La descripción de la realización de la presente invención no pretende limitar su alcance, sino servir como un ejemplo particular de la misma. Se espera que una persona versada en la materia comprenda que las modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la presente invención en su forma más amplia.

La presente invención revela un biosensor para la detección temprana de cancer, basado en un electrodo con nano partículas que tienen selectividad hacia las células cancerosas.

El bisensor de la invención comprende un electrodo basado en un nanomaterial de TiO_2 modificado, el cual es selectivo a las células cancerosas.

Los electrodos modificados químicamente son superficies químicamente modificadas por una película delgada de un producto químico seleccionado que se adhiere o recubre la superficie del material conductor modificando la superficie con propiedades deseadas.

El nanomaterial de TiO_2 contenido en el biosensor de la invención se obtiene mediante síntesis sol – gel, (proceso que introduce materia orgánica como los grupos funcionales de tipo carboxilos a la superficie de las partículas de TiO_2).

En una modalidad de la invención, el TiO_2 es modificado con nanotubos de carbono y grupos funcionales tipo carboxilos.

En otra modalidad particular de realización de la invención, el nanomaterial es TiO_2 fase anatasa y está modificado con folato.

En otra modalidad particular de realización de la invención, el nanomaterial es TiO_2 fase anatasa y está modificado con folato y nanotubos de carbono multicapa funcionalizados, (TiO_2 -FMWNTs-Folato).

El nanomaterial de TiO_2 contenido en el biosensor de la invención presenta diámetros de 20 a 30 nm y longitud de 10 a 30 μm .

La funcionalización del TiO_2 permite la interacción entre célula y el nanomaterial, donde el TiO_2 modificado se adhiere a una superficie basada en un material conductor eléctrico.

En la modalidad preferida de la invención, el TiO_2 modificado se adhiere a una superficie de grafito pirolítico, configurando un electrodo útil para el reconocimiento de células cancerosas.

En dicha modalidad, el grafito pirolítico es objeto de pre-tratamiento para la generación de óxido de grafeno GO en su superficie, a partir de ácidos fuertes (sulfúrico, nítrico y clorhídrico).

El electrodo de TiO_2 modificado se encuentra soportado en óxido de grafeno y grafito pirolítico, donde el óxido de grafeno GO se encuentra entre 0.1% y 10% p/p y el grafito pirolítico HPOG entre 90 y 99% p/p.

Cuando un electrodo de metal se sumerge en una solución electrolítica, se forma una doble capa eléctrica (EDL) en la interfaz entre el metal y el electrolito. Una capa de carga está ubicada en la superficie del metal y la otra, de carga igual y opuesta, justa dentro de la solución electrónica.

El electrodo de TiO_2 - modificado permite que las células cancerosas emitan señales electroquímicas, debido a la distorsión de la doble capa eléctrica, donde a mayor cantidad de células adheridas al electrodo, es mayor la señal, permitiendo determinar el reconocimiento de las células cancerosas al convertir dicha señal electroquímica en una señal de detección de células cancerosas.

La concentración de células cancerosas en medio acuoso es directamente proporcional a la señal electroquímica en corriente susceptible de medición.

Funcionalización del Grafito Pirolítico.

En la modalidad preferida de la invención, las interacciones interfaciales entre el grafito sólido y el medio de reacción líquida y el transporte del agente oxidante al grafito [77] permite la modificación de la superficie mediante la introducción de grupos funcionales, generando la modificación de las propiedades físicas - químicas del material.

La funcionalización superficial permite generar puntos de anclaje, que interactúan con los grupos funcionales presentes en los nanomateriales a impregnar en la superficie. Los métodos más utilizados para la funcionalización son la oxidación-exfoliación y reducción. Durante estos procedimientos, se encuentran átomos de oxígeno y de grupos funcionales.[132]

A continuación, se describe una modalidad, no limitativa, del proceso de funcionalización del grafito pirolítico comprendido dentro del biosensor de la invención.

Para la obtención de los electrodos de prueba, se parte de una varilla sólida de HOPG, de diámetro de 2,1 cm y longitud de 60 cm; se cortan placas planas con espesor de 1.5 mm (cortador de diamante Buehler) conservando el diámetro original de la varilla sólida.

Las placas de HOPG se pulen con lijas de 600, 1000, 1200; luego, se limpian en un baño de ultrasonido durante 15 minutos en una disolución de etanol al 30%; transcurrido el tiempo, se retira cada placa, se lava con agua desionizada y se seca.

Se realiza la funcionalización por oxidación-exfoliación en solución de H_2SO_4 y HNO_3 relación 3:1 (solución piraña); para la modificación de la superficie de HOPG, la solución piraña se impregna por el método de spray coating, formando enlaces covalentes y no covalentes [133]. El tiempo de oxidación fue de 2, 4, 6 y 12 horas a temperatura de 26 °C.

La funcionalización mediante oxidación-exfoliación puede efectuarse también con tres ácidos, esto es, H_2SO_4 y HNO_3 (relación 3:1) y luego HCl equivalente a 2/3 durante 10 minutos, en tiempos de 2, 4, 6 horas.

Luego, se neutralizan las placas con NH_4OH al 5% hasta llegar a un pH neutro de 7,2. Posteriormente, se lavan con agua desionizada para eliminar los reactivos restantes utilizados en la funcionalización. Finalmente, las placas se secan a 100°C durante 24 horas.

A continuación, las placas de grafito con óxido de grafeno (GO), obtenidas de la funcionalización (oxidación), se caracterizan por Microscopía Electrónica de Barrido, (SEM- EDS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia Raman. Las placas quedan listas para ser recubiertas con TiO_2 – modificado.

En los ejemplos de realización de la invención que se describen en la presente memoria descriptiva, la nomenclatura dada a estas placas fue GO2 para dos ácidos y GO3 para 3 ácidos.

Preparación del sol -gel TiO₂ – Modificado.

Se prepara el TiO₂-m utilizando el método de sol – gel con n-butoxido de Titanio, con etanol y agua destilada desionizada para la obtención de nanopartículas de TiO₂-modificado.

- 5 El n-butoxido se mezcla con alcohol anhidro. Las soluciones se mantuvieron en agitación magnética constante durante 15 minutos y finalmente se le añadió agua desionizada gota a gota. Para lograr la reacción completa, se deja reposar por 0, 1, 2, 3, 4 o 5 días.

El tiempo de reposo del sol-gel se incluye en la nomenclatura de los ejemplos de
10 realización de la invención que se describen en la presente memoria descriptiva, como un tercer dígito, y la presencia de TiO₂-m se incluye como una letra inicial T; por ejemplo, TGO320 es grafito pirolítico, oxidado con 3 ácidos durante 2 horas e impregnado superficialmente con sol-gel de TiO₂-m con cero días de reposo.

Las placas de grafito pirolítico funcionalizado, se impregnaron superficialmente a 27
15 °C con sol–gel de TiO₂–m a pH 7,0.[134].

A las placas de GO recubiertas con TiO₂-m se les trató térmicamente en dos pasos. En el primer paso, la temperatura subió hasta 150°C en 15 minutos; luego se sostuvo a dicha temperatura por 30 minutos. En el segundo paso, la temperatura subió hasta 500°C en 30 minutos. Finalmente, se mantiene constante la temperatura
20 durante 45 minutos, obteniendo placas TiO₂-m soportado en la capa de óxido que está sobre el sustrato de grafito pirolítico (TiO₂-m/GO/HOPG).

Las placas fueron caracterizadas morfológicamente por SEM-EDS y perfilómetro de las placas, composicionalmente por FTIR, DRX y Raman.

En una modalidad de realización de la invención, el biosensor detecta células de
25 leucemia mieloide crónica. Las células utilizadas fueron línea celular K - 562 (ATCC® CCL- 243 TM) en medio Iscover. La celda fue diseñada de teflón (material biocompatible), con las células cancerosas con una capacidad de 1ml de disolución.

Los blastos K-562 son células malignas hematopoyéticas multipotenciales. Se diferencian espontáneamente en progenitores reconocibles de las series eritrocítica,
30 granulocítica y monocítica; contienen la función del gen b3a2.

En este ejemplo particular, el medio de cultivo recomendado por el proveedor de las células para el crecimiento de la línea celular K562 es Dulbecco modificado con Iscover del DMEM. Se añade suero fetal bovino al 10% y estreptomicina (100 µgmL-1). Se renueva o cambia el medio de cultivo cada 2 a 3 días, (subcultivos a partir
35 de 1x10⁵, incubado a 37° C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂) [28]. El medio incluye Bicarbonato de Sodio, gentamicina.

El estudio de las células cancerosas K-562 se realizó con la colaboración y apoyo del grupo Farmacología Univalle de la Facultas de Salud – Universidad del Valle.

Para el crecimiento de las células K-562 se tomó en consideraciones las variables: temperatura, porcentaje de presencia de CO₂ en atmosfera de aire de incubadora,
 5 el pH, substrato para la adhesión celular, medio de cultivo apropiado y una osmolalidad correctos[135].

El Protocolo de Cultivo celular (células K-562) presentó la siguiente información:
 Líneas K562 (ATCC® CCL-243TM) (Leucemia Mieloide Crónica), pertenecientes
 Organismo: Homo sapiens, tejido humano: médula ósea, Enfermedad: leucemia
 10 mielógena crónica, CML, Edad: 53 años, Género: mujer, Morfología: linfoblasto
 Propiedades de crecimiento: suspensión [114]

Para el proceso de descongelación de la línea celular se realizaron las siguientes etapas:

- 1.- Se descongela el vial agitando suavemente en baño maría a 37°C.
- 15 2.- En el vial debe observarse un fino hilo de hielo, se retira del agua y se frota para realizar un descongelamiento instantáneo (tiempo 2 min).
- 3.- Para descontaminar se rocía con etanol al 70% al vial.
- 4.- Con una probeta de 5 mL se añade 15 ml de medio Iscover preparado a un frasco de cultivo. Con la pipeta de 2,5 mL se toma las células del vial y se traslada al frasco
 20 de cultivo. Se Incuba a 37 °C al 5% de CO₂ en atmósfera de aire.

Procedimiento de manejo para cultivos en matraz.

- 1.- Se examina visualmente el cultivo para detectar evidencia macroscópica de cualquier contaminación microbiana.
- 2.- El matraz debe ubicarse verticalmente hasta que se consuma totalmente el
 25 medio, observando un crecimiento de células. Se traslada al medio de células a un falcón, se centrifuga durante 10 minutos a 1250rpm.
- 3.- Se retira de la centrifuga el sobrenadante. En la punta de falcón se deja las células.

A continuación, se coloca 2 mL de medio sobre las células; se mezcla suavemente
 30 y se completa con 18 mL, trasladando a la caja de cultivo para su incubación.

Procedimiento para el cambio de medios. (Renovación del medio: cada 2 a 3 días).

- 1.- Se retira la caja de cultivo de la incubadora. Se esteriliza con alcohol y se lleva a la cabina. Con una pipeta de 5mL se remueve el medio con células K-562 sin causar stress celular.

2.- El medio con células K-562 es trasladado a un falcón de 15 mL. Se centrifuga a 1500 – 2000 rpm por 5 minutos. La centrifugación se realiza para que queden en forma de pellet en el fondo las células y el sobrenadante se descarta.

3.- Al pellet de células se le añade 5 mL de medio, se traslada a la caja y se le completa con 10 mL de medio se lo incubaba a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera de aire.

Viabilidad y conteo Celular.

Una gota de cultivo celular se ubicó en una placa de vidrio con azul de tripán. La viabilidad y proliferación de las células K.562 se determina con el azul de tripán a los 0 días, 24 horas por conteo celular, después de la siembra inicial.

El proceso de conteo celular se realiza de la siguiente forma:

1.- Se toma 100uL del medio con células K-562 se mezclan con 400 µL de azul de tripán en un ependort relación (1:4).

2.- Se coloca en la cámara de Neubaver 10µL de la mezcla, se cuenta las células no coloreadas por el azul de tripán.

3.- Se realiza el recuento de las células K-562 empezando por el primer cuadrante y continuando por los demás cuadrantes de la cámara de Neubar.

4.- Se registra la cantidad de células de los 4 cuadrantes y se procede con el cálculo de la concentración de células obtenidas por caja.

20 Procedimiento del recubrimiento de células K-562 sobre los electrodos de (TGO).

1.- Las placas (TGO) se esterilizaron para evitar la contaminación del cultivo celular.

2.- Las placas esterilizadas de (TGO) se ubicaron en cajas Petri para suspender el medio con células K-562 Figura 24.

3.- Se realizó el conteo celular de las cajas.

25 4.- Se tomó una concentración de 1×10^6 células/ mL.

5.- Con una pipeta de 2,5mL se toman células K-562. Se cubren las placas de (TGO), observando que las placas queden totalmente cubiertas.

6.- Se incuban las cajas Petri con las placas durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera de aire.

30 El sensor de la presente invención actúa como generador de señal electroquímica, de la que se toma la señal eléctrica ara convertirla en medida de detección de células cancerosas.

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos hay una polarización de éstos, donde se acumula carga en su superficie y, al existir una influencia de un campo eléctrico, los iones de carga contraria a la del electrodo polarizado son atraídos hacia éste mientras que los iones con carga del mismo signo son repelidas. En consecuencia, se forma una capa de iones junto a la superficie del electrodo.

Para realizar estas medidas electroquímicas es necesario disponer una celda electroquímica, la cual, debe estar formada por un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

- 10 A efectos de la presente invención, se realiza la medida electroquímica de la reacción de la especie bioquímica (células K-562) sobre la superficie del electrodo de TiO_2 - modificado/GO/HOPG, existiendo el intercambio de electrones con el electrodo.

- 15 El electrodo de referencia, el cual realiza la medida con un comportamiento conocido, es un electrodo de Ag/AgCl, manteniéndose este a una distancia fija del electrodo de trabajo y el contraelectrodo que es aquel que cierra el circuito con el electrodo de trabajo a través del medio. Los parámetros utilizados en el estudio de la reacción redox son la corriente, potencial, la carga, y los parámetros químicos como el pH y concentración.

- 20 En estas condiciones, se realizaron dos diseños de celdas. Una celda electroquímica de vidrio que trabajaría con volúmenes de (10mL – 15mL), permitiendo que los electrodos ingresen al electrolito. El electrodo de trabajo TGO de área 0,41cm, electrodo de referencia plata/cloruro de Plata (Ag/AgCl) y un contraelectrodo de platino, manteniendo un contacto (electrodo/ medio- células K-562).

- El segundo diseño consiste en una celda de teflón con un área definida. Los electrodos se encuentran instalados de tal forma que las distancias están definidas sin que exista alguna variación en el momento de ensamblar el dispositivo. El volumen de trabajo pudo variar (0,5mL – 1mL), el electrodo de trabajo fue plano, con área definida de trabajo 0,41cm, electrodo de referencia (Ag/AgCl) y un contraelectrodo Platino 99,9%.

La construcción de la segunda celda está diseñada de tal forma que los tres electrodos entren en contacto con el medio y las células K-562, obteniendo una detección rápida.

- 35 Para el diseño de celda se evaluó la cantidad de muestra, el monitoreo, la facilidad de ensamblaje, la celda que genere un mayor porcentaje de eficiencia con menores concentraciones de células y el que no intervenga con reacciones del electrolito con el material de la celda.

Las concentraciones de células/ml utilizados son de 1'000.000, 500.000, 100.000, 25.000, 6.250, y 1562 células /mL. Se elige estas concentraciones por estar dentro del rango de los diagnósticos actuales de los pacientes de leucemia mieloide crónica que oscilan entre 15 células/mL hasta 500.000células/mL[136] en los análisis de sangre donde existe números elevados de glóbulos blancos, con un aumento de los granulocitos, en menor medida de basófilos[137].

Se construye la celda con los tres electrodos, esto es, el electrodo de referencia, el contraelectrodo y el electrodo de trabajo TGO. Con una micropipeta se toman las concentraciones deseadas, se coloca en el orificio de la celda, se realiza la conexión de los electrodos y potenciostato- galvanostato observando la señal VC, los cambios de oxidación o reducción en la interfaz del electrodo.

Para los procedimientos de pruebas electroquímicas (Voltametría cíclica), Se utilizó el programa Nova 2.1 Metrohm Autolab. Se escribe los rangos de los potenciales superior e inferior, el número de escaneado y la velocidad de barrido.

La técnica aplicada es la cronoamperometría ($\Delta t > 1ms$) a diferentes concentraciones aplicando un Voltaje 0 con duración de tiempo de 1200 s e intervalos de tiempos de 0,01s

Se utilizó el programa Nova 2.1 Metrohm Autolab, a diferentes concentraciones de célula/mL, aplicando amplitud de pulso 0,025 con un rango de potencial (-0,20V a 0,20V) intervalos de tiempo 0,05.

La morfología del grafito pirolítico forma una superficie irregular con un espesor promedio de 2,4 μm . El espesor del recubrimiento del TiO₂- modificado sobre la superficie del HOPG se encuentra entre 22 y 55 μm .

Para el análisis de microscopia de fluorescencia, las células K-562 (Leucemia Mieloide Crónica) se incubaron durante 24 horas sobre la superficie de las placas de TGO220, TGO240, TGO260, TGO320, TGO340, TGO360.

En la modalidad preferida de la invención las células son fijadas con glutaraldehído y lavadas con PBS pH 7.4

A continuación, se tiñeron los núcleos celulares con DAPI [152] donde se visualiza ADN de las células, la forma geometría y adherencia al TiO₂-m.

En la Figura 1 se observa la placa TGO360 en diferentes secciones en la fig. 1a) una sección de la placa TGO360 muestra que existe gran cantidad de células adheridas al TiO₂-m de geometría redonda y formando agrupación de células sobre las placas. La fig. 1b) Muestra una toma fotográfica de las células dispersas sobre la superficie, adheridas al nanomaterial.

Las imágenes de microscopia de fluorescencia y la cuantificación de las células adheridas sobre las placas TGO revelan que el incremento de células en las placas va depender del tratamiento y recubrimiento del TiO₂-modificado. Cabe destacar, que a mayor porcentaje de recubrimiento de TiO₂-modificado, mayor será la cantidad de células adheridas.

La Figura 2 muestra el cultivo de las células K-562 sobre el sensor, (placas recubiertas TGO), tratadas con tres ácidos con intervalos de tiempo de 6 horas de rociado e impregnadas con sol – gel de TiO₂ – m 0 días. En la figura 2a) se observa la presencia de estas células. La figura 2b) muestra la fragmentación del recubrimiento de TiO₂-modificado donde se encuentran las células adheridas, formando grupos celulares. La figura 2c) Muestra células redondas adheridas al TiO₂-modificado. La figura 2d) muestra como las células K-562 se adhieren a la superficie de grafito pirolítico por medio de Pseudopodos o falsos pies.

Para determinar la detección de la señal electroquímica entre el sensor de la invención y las células de leucemia mieloide crónica (células-K562), al igual que la sensibilidad del sensor para detectar la presencia de las células cancerosas con menor concentración, se caracteriza por voltametría cíclica y cronoamperometría la señal detectada por el sensor al entrar en contacto con las células.

Se emplean las placas TGO220, TGO240, TGO260, TGO320, TGO340, TGO360 y la placa de Grafito pirolítico como placa de control las pruebas. Las pruebas se realizan a diferentes concentraciones de células K-562/mL como electrolito (medio Iscover). Además, se realizó las mediciones electroquímicas a diferentes velocidades de escaneo.

La celda empleada en esta realización tiene tres electrodos: electrodo de trabajo TGO, el contraelectrodo basado en alambre de platino y el electrodo de referencia Ag/AgCl.

Se trabaja el medio con células en suspensión como electrolito. Al trabajar con diferentes concentraciones de células estas van a producir una reacción de óxido – reducción, la cual va a dar como resultado una señal electroquímica.

Resultados de Voltametría Cíclica.

Se realizaron pruebas preliminares para observar la respuesta de corriente en las placas HOPG, placas GO26, placa GO36, TGO260 y TGO360, utilizando como electrolito el medio Iscover sin células con rangos de potencial de (-0,4 a 1,4V) y una frecuencia de barrido de 0,020 V/s.

La Figura 3 muestra que la placa de HOPG no presenta respuesta de corriente, mientras que las placas funcionalizadas con ácidos como GO26 presenta una respuesta de corriente $8,82 \times 10^{-4} \text{ A}$ a (1,4V). La placa GO36 muestra una respuesta

de corriente 0,0013A a (1,4V), mientras que las placas recubiertas con TiO2-m, TGO260 presenta una respuesta de corriente de 0,0016A; la muestraTGO360 tiene una respuesta de corriente 0,0024A a (1,4V), presentando un incremento significativo en los picos de respuesta.

- 5 Se realizaron pruebas adicionales con mayor concentración de células y menor concentración de células. En la Figura 4 se observa la respuesta de corriente con una concentración de 1X10⁴ células/mL.

Cabe indicar que el grafito pirolítico no presenta respuesta de corriente, mientras que en las muestras funcionalizadas con ácidos GO26, GO36 presenta una
10 respuesta de corriente menor a 1,4V. Esto se puede relacionar con la observación de células adheridas al sustrato mediante las pruebas realizadas por microscopia electrónico de barrido.

La respuesta más alta de corriente a 1,4 V se observa en las placas de TGO260 con una corriente 18,9 X10⁻⁴ A, y en la placa TGO360 con una corriente de 43,2X10⁻⁴ A. Esta respuesta de corriente significa que la presencia de TiO2-m en la superficie
15 GO presenta cambios en el electrodo debido a la adherencia de las células al TiO2-modificado. En consecuencia, la respuesta indicada y relacionada con la microscopia electrónica de barrido en la cual se observan las células adheridas al TiO2-m, lo que significa que el tratamiento y el recubrimiento hacen que genere una
20 respuesta debido al cambio de la estructura de la superficie.

Se realiza el análisis en el punto de partida de 0,4V para comprobar el incremento en la respuesta de la señal de acuerdo con los valores que se presenta en la tabla 1.

Muestra	Intensidad de corriente (A)
HOPG	0,23 X10 ⁻⁵
GO26	4,42X10 ⁻⁵
GO36	9,17 X10 ⁻⁵
TGO260	9,55 X10 ⁻⁵
TGO360	20,3 X10 ⁻⁵

25 Tabla 1. Respuesta de señal de intensidad de corriente.

Una vez concluida las pruebas preliminares se estandariza el rango del potencial. Se trabaja con potenciales de (-0,1893V a 0,9616V), con un rango de barrido a 0,01V/s, puesto que es la velocidad que presenta mayor respuesta de corriente.

La Figura 5 muestra la Voltametría cíclica del sensor correspondiente al sistema de medio sin células y al medio con células con variaciones de concentración de (6250 células/mL- 1X10⁶ millones de células/mL) a una velocidad de barrido de 0,01V/s donde se observa que a concentraciones pequeñas presenta un pico de oxidación y a concentraciones mayores de 500.000 células /mL picos propios del medio [157].

Se observa que para la concentración de 5X10⁵ células/mL y 1.0X10⁶ células/mL muestra un comportamiento de microelectrodo cuando se tiene cantidades pequeñas de células a microelectrodo cuando se tiene mayor cantidad de células [158].

La detección electroquímica del grafito pirolítico es afectada por residuos celulares. Como consecuencia, tiene un comportamiento celular con un potencial alto en un rango de concentración de (100.000 células/mL a 500.000 células/mL) mientras que cuando se tiene concentraciones de 30.000 células/mL el potencial no es alto con potenciales negativos, y como resultado se evidencia en la microscopia de fluorescencia donde se observó los residuos celulares en el grafito pirolítico.

La Figura 6 muestra las variaciones de los potenciales (153,3mV – 82,5mV) a una intensidad de corriente cero con respecto al electrodo TGO360 para el medio solo, en comparación con los potenciales del electrodo TGO360 con células K-562. Como resultado se observa un potencial alto para una concentración de un millón de células, seguido de 25.000 células /mL y 6250 células/mL.

En la Tabla 2 se muestra variaciones de potenciales (113mV – 52mV) a una intensidad de corriente 0. A continuación se observa que el electrodoTGO360 con medio Iscover tiene un potencial de 103,4mV, si comparamos los potenciales más altos obtenidos del electrodo TGO360 con un millón de células/mL, 500.000 célula/mL y 25.000 células/mL presentando un incremento con respecto al potencial del medio.

Concentraciones	Potencial (mV)
Medio	103,4
1`000.000	103,1
500.000	113,4
100.000	52
25000	81,1
6250	75,4
1562	92,4

Tabla 2. Resultados del potencial con relación a la concentración.

Con los resultados obtenidos de la Voltametría diferencial de pulso, y apoyados en la microscopia de fluorescencia y microscopia electrónica de barrido, al observar la mayor cantidad de células adheridas a la superficie del sensor de la presente

invención y observando la presencia de picos de corriente en el más amplio rango de concentraciones celulares, se realiza una curva de calibración del electrodo TGO360, para usarlo en el biosensor electroquímico de TiO2-m para células de leucemia mieloide crónica (K-562).

5 La curva de calibración se trabajó con los promedios de las respuestas de corriente de tres replicas, a cada una de las concentraciones de células, en el rango (6250 – 1’000.000 células/mL), obteniendo una regresión lineal con R² de 98%.

Como consecuencia a la respuesta obtenida, la curva de calibración a trabajar para el biosensor es la regresión lineal, de acuerdo con la ecuación: $y= 2 \times 10^{-5}x + 72,67$
10 como se muestra en la Figura 7.

El análisis de los tiempos de detección del biosensor se presenta en la Tabla 3, donde se observa la variación de los tiempos con el incremento de la corriente eléctrica y el potencial al que se encuentra la formación del pico que varia de (21 – 30) segundos, dependiendo la concentración de células.

Potencial (V)	Tiempo (s)	Concentración (células/mL)
0,00137	21,87	6250
0,09201	30,37	25.000
0,01144	22,37	100.000
0,02655	23,87	500.000
0,04165	25,39	1’000.000

15

Tabla 3. Técnica voltametría diferencial de pulso.

En la Voltametría diferencial de pulso se necesita tener en contacto el electrodo y la muestra de células en un mínimo tiempo que lo mide el potenciostato, unidad de medida mínima en tiempo para que determine la concentración de células, en este
20 ejemplo, de leucemia mieloide crónica K-562.

A diferencia de diversos reportes comprendidos dentro del estado de la técnica, en donde el tiempo de detección alcanzado es de 60 min, tales como el biosensor de células HeLa con una interacción de FA.FR [166], (Xuan, 2015), que utiliza la técnica de amperometría y un electrodo de nano grafeno con nanopartículas de oro (Au
25 NPs)[167], con una intensidad de corriente a los 20 segundos con una concentración de 1106 células/mL [168], el biosensor de la presente invención demostró una variación de concentración de 6250 a 1X10⁶ células/mL mostrando una buena reproducibilidad y sensibilidad en la detección de las células K-562 con que ajusta a una curva de calibración con un valor R² del 98% con un rango de
30 respuesta en tiempo que varía de 20 a 30 segundos.

En consecuencia, el tiempo de detección, el rango de las concentraciones y el proceso de fabricación, hacen que el biosensor de la presente invención sea adecuado para la detección de células cancerosas como las K-562.

5 Las características técnicas estructurales del dispositivo de detección temprana de cáncer de la presente invención, aporta soluciones a varios problemas relacionados con tratamientos temprano de esta enfermedad, disminuyendo, posiblemente, la tasa de mortalidad, al igual que el gasto público asociado a los tratamientos agresivos contra el cáncer.

10

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

25

30

REFERENCIAS

- [4] "Cancer statistics, 2017 - Siegel - 2017 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library.pdf." doi: Volume 65, Issue 1 January/February 2015 Pages 5–29.
- 5 [5] J. Ferlay, "Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018 : GLOBOCAN sources and methods," doi: 10.1002/ijc.31937.
- [9] A. Santoyo-Sánchez *et al.*, "Leucemias agudas Características clínicas y patrón estacional," *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, vol. 52, no. 2, pp. 176–81, 2014, doi: 10.1016/S0211-3449(08)75399-2.
- 10 [11] B. E. Semanal, "Comportamiento epidemiológico del cáncer en menores de 18 años .," 2019.
- [12] U. del Valle, "REGISTRO POBLACIONAL DE CANCER DE CALI, COLOMBIA. (2009-2013)," *Registro Poblacional de Cáncer de Cali*, 2013. .
- [13] "Tumores malignos según localización topográfica por grupos de edad," no. 258, p. 2017, 2017.
- 15 [16] Y. M. Alomari, S. Norul, H. Sheikh, R. Z. Azma, and K. Omar, "Automatic Detection and Quantification of WBCs and RBCs Using Iterative Structured Circle Detection Algorithm, Automatic Detection and Quantification of WBCs and RBCs Using Iterative Structured Circle Detection Algorithm," *Comput. Math. Methods Med. Comput. Math. Methods Med.*, vol. 2014, 2014, p. e979302, 2014, doi: 10.1155/2014/979302, 10.1155/2014/979302.
- 20 [17] A. Lassaletta Atienza, "Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda," *Pediatr. Integr.*, vol. 20, no. 6, pp. 380–389, 2016, doi: 10.1016/B978-84-8174-886-4.50009-X.
- [23] Q. Shen *et al.*, "Electrochemical biosensing for cancer cells based on TiO₂/CNT nanocomposites modified electrodes," *Electroanalysis*, vol. 20, no. 23, pp. 2526–2530, 2008, doi: 10.1002/elan.200804351.
- 25 [24] L. Chen *et al.*, "Organic Electrochemical Transistors for the Detection of Cell Surface Glycans," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 22, pp. 18470–18477, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b01987.
- [25] Y. Wang *et al.*, "Ultra-sensitive and ultra-fast detection of whole unlabeled living cancer cell responses to paclitaxel with a graphene-based biosensor," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 263, pp. 417–425, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.02.095.
- 30 [77] A. M. Dimiev *et al.*, "Terms of Use Mechanism of Graphene Oxide," no. 3, pp. 3060–3068, 2014.
- 132 L. Hao, X. Li, and L. Zhi, "Carbonaceous Electrode Materials for Supercapacitors," pp. 1–6, 2013, doi: 10.1002/adma.201301204.
- 35 134. "膨胀石墨负载锐钛矿型纳米 Ti₂ 的制备及光电催化性能."
135. U. States, "Cell Culture Media : A Review," pp. 1–29, 2017.
137. K. A. Khan, A. Junaid, N. S. Siddiqui, K. Mukhtar, and S. Siddiqui, "Imatinib-related bone marrow aplasia after complete cytogenetic response in chronic myeloid leukemia," *J. Coll. Physicians Surg. Pakistan*, vol. 18, no. 3, pp. 176–178, 2008.
- 40 152. A. F. S. Queiroz *et al.*, "Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells," pp. 1023–1033, 2009, doi: 10.1007/s00280-008-0825-4.
157. O. Akbal, G. Bolat, Y. T. Yaman, and S. Abaci, "Folic acid conjugated Prussian blue nanoparticles: Synthesis, physicochemical characterization and targeted cancer cell sensing," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 187, no. November 2019, p. 110655, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110655.
- 45 168. H. Chang *et al.*, "Layer-by-layer assembly of graphene, Au and poly(toluidine blue O) films sensor for evaluation of oxidative stress of tumor cells elicited by hydrogen peroxide," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, no. 1, pp. 789–794, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.10.001.

5

10

15

20

25

5

10

15

20

25

30

5

10

15

20