



**Universidad
de La Laguna**

Trabajo de Fin de Grado

**Síntesis y caracterización de nanopartículas
modificadas con GPTS para la detección
electroquímica de IL-6**



**Evelyn Díaz González
5º Grado en Farmacia
Curso 2022-2023**

Tutores:

Soledad Carinelli y Pedro Salazar Carballo

Departamento de Ciencias de la Salud

Área de Fisiología

Departamento de Medicina Física y Farmacología

Área de Medicina Física y Radiología

La Laguna, 2023



Me gustaría expresar mi agradecimiento a mis tutores de este Trabajo de Fin de Grado, Soledad Carinelli y Pedro Ángel Salazar Carballo por su orientación y apoyo constante durante todo el proceso de experimentación y redacción. Asimismo agradezco a mis compañeros de laboratorio por su valiosa ayuda y consejos dados. También me gustaría agradecer a mis amigos y compañeros de clase por su apoyo y motivación. Por último, agradezco a mi familia y pareja por su apoyo incondicional no solo durante este TFG sino durante todos los años de carrera. Gracias.

**ÍNDICE**

ABSTRACT	3
RESUMEN	4
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Interleuquina IL-6	7
1.2. Biosensores electroquímicos	8
1.3. Nanopartículas magnéticas	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES	13
3.1. Reactivos biológicos	13
3.2. Tampones	13
3.3. Reactivos químicos	13
4. MÉTODOS	15
4.1. Síntesis de las nanopartículas magnéticas (MNPs)	15
4.2. Funcionalización de las MNPs	15
4.3. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	16
4.4. Biofuncionalización de las MNPs-GPTS con Ab _{α-IL-6}	16
4.5. Estrategia inmunomagnética para determinación de IL-6	16
4.6. Medidas electroquímicas	18
5. RESULTADOS	21
5.1. Caracterización de las nanopartículas	21
5.2. Selección del sistema enzimático de marcación	21
5.3. Optimización del volúmenes de muestra	22
5.4. Optimización del tiempo de incubación	23
5.5. Curva de calibrado	24
6. CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	31
Anexo 1. Fundamentos de las medida electroquímicas	31
Anexo 2. Caracterización de nanopartículas	33

**ABSTRACT**

Interleukin 6 (IL-6) is a proinflammatory cytokine used as clinical biomarker of systemic inflammation associated with infections, autoimmunity and cancers. In healthy people, it is present at very low level (<6 pg/mL) in serum, and it is an excellent biomarker for diagnostic applications, illness progression and monitoring of subsequent therapy. In addition, during the COVID-19 pandemic, high levels of IL-6 were associated with poor prognosis of the disease progression, and it was correlated with the use of mechanical ventilation, and respiratory failure. This work addresses a sandwich bioassay for electrochemical detection of IL-6 based on home-made epoxy-modified magnetic nanoparticles (MNPs). MNPs were conveniently synthesized with (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTS) and functionalized with specific anti-IL-6 antibody. The different stages during the MNPs@GPTS synthesis and their modifications were evaluated with XRD, FT-IR, thermogravimetric and BET analysis. IL-6 protein was preconcentrated using immunomagnetic separation based on MNPs@GPTS-IL-6 and it was electrochemically detected on commercial screen-printed electrodes using a peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin. After the optimization of different experimental conditions (incubation time and sample volume, among others) the main analytical parameters such as sensitivity, limit of detection, linear range, and reproducibility of the strategy were estimated.



RESUMEN

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina proinflamatoria utilizada como biomarcador clínico de la inflamación sistémica asociada a infecciones, autoinmunidad y cánceres. En personas sanas, está presente en niveles muy bajos (<6 pg/mL) en suero, y es un excelente biomarcador para aplicaciones diagnósticas, progresión de la enfermedad y monitorización de las recidivas. Además, durante la pandemia de COVID-19, los altos niveles de IL-6 se asociaron con un mal pronóstico de la progresión de la enfermedad, y se correlacionó con el uso de ventilación mecánica, e insuficiencia respiratoria. Este trabajo aborda un bioensayo tipo sándwich para la detección electroquímica de IL-6 basado en nanopartículas magnéticas (MNPs) modificadas con grupos epoxi y diseñadas *ad hoc* en el laboratorio. Las MNPs fueron convenientemente sintetizadas y modificadas con (3-glicidioxipropil)trimetoxisilano (GPTS), posteriormente fueron biofuncionalizadas con anticuerpos específicos anti-IL-6. Las diferentes etapas durante la síntesis de MNPs@GPTS y sus modificaciones se evaluaron con XRD, FT-IR, análisis termogravimétrico y análisis de adsorción/desorción de gases. La proteína IL-6 se preconcentró mediante separación inmunomagnética usando las MNPs@GPTS-IL-6 como elemento de biorreconocimiento y se detectó electroquímicamente sobre electrodos serigrafados comerciales utilizando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (HRP). Tras la optimización de diferentes parámetros experimentales (tiempo de incubación y volumen de muestra, entre otros), se estimaron los principales parámetros analíticos tales como: sensibilidad, límite de detección, rango lineal y reproducibilidad del método analítico.



ABREVIATURAS

Tabla 1. Abreviaturas empleadas durante el TFG

Concepto	Abreviación
Citoquina	Cq
Interleuquina 6	IL-6
Interleuquina 1	IL-1
Factor de Necrosis Tumoral alfa	TNF- α
Interleuquina 17	IL-17
Nanopartículas magnéticas	MNPs
(3-glicidoxipropil) trimetoxisilano	GPTS
Fosfatasa alcalina	ALP
Peroxidasa del rábano picante	HRP
Anticuerpo de captura	Ab _{cap}
Anticuerpo anti-IL-6 con Biotina	Ab _{α-IL-6}
Avidina-fosfatasa alcalina	Av-ALP
Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	Estrep-HRP
Tampón 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol	TRIS
Tampón Fosfato Salino	PBS
Albúmina sérica bovina	BSA
Voltametría de pulso diferencial	DPV
Señal/Blanco	S/B
Hidroquinona	HQ
Benzoquinona	BQ
Límite de detección	LOD
Difractograma de rayos X	XRD
Isotermas adsorción/desorción de nitrógeno	BET
Análisis termogravimétricos	TG/TDA
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	FT-IR



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interleuquina IL-6

La Interleuquina (IL-6) es una citoquina (Cq) o molécula de comunicación intercelular producida por macrófagos, células dendríticas, células endoteliales vasculares, fibroblastos y linfocitos T, como respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (bacterianos o víricos) o a la presencia de otras Cq como la IL-1 o TNF- α .

Tiene actividad tanto inflamatoria como antiinflamatoria, ya que su producción frena por retroalimentación negativa la producción de las Cq inflamatorias nombradas anteriormente.

Su principal función inmunitaria es la diferenciación y maduración de linfocitos T y B, junto con la generación de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, haptoglobina, proteínas del complemento o de la cascada de la coagulación.

También junto con la IL-1 y el TNF- α regulan la termogénesis y son factores pirógenos. Por otro lado, estimula la producción de colonias de precursores hematopoyéticos (granulocitos y macrófagos).^[1]

Tiene funciones óseas, interviene en la nocicepción, actúa a nivel del endotelio vascular, está involucrada en la patogénesis de la sepsis y promueve la diferenciación de linfocitos T cooperadores productores de IL-17.^[2]

La producción de IL-6 está aumentada durante la inflamación. Esta Cq es un contribuyente importante en varias enfermedades inflamatorias humanas, como por ejemplo las enfermedades reumáticas, principalmente en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, osteoporosis o espondiloartropatías.^[1]

Sin embargo, para poder considerar que un nivel de IL-6 es indicativo de inflamación se debe tener en cuenta el contexto y la concentración local.^[1]

Tabla 2. Niveles de IL-6 en diferentes patologías.

Patología	Niveles de IL-6 (pg/mL)	
	Normales	Patológicos
Cáncer de pulmón (estudio en varones) ^[3]		19,79 - 29,08
Dengue ^[4]		9,50 - 22,88
Diabetes tipo II ^[5]	< 6	1,30 - 167,0
Artritis reumatoide ^[6]		1,20 - 7,00

En la actualidad, el uso de bloqueadores de la IL-6 se ha empleado durante la pandemia del COVID-19 donde los niveles séricos se han visto muy incrementados durante el proceso infeccioso y sobre todo en casos severos.^[7]



Durante años se han utilizado diferentes técnicas para la detección de IL-6 como los inmunoensayos de fluorescencia o ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA). Dichos análisis suelen realizarse en laboratorios centrales hospitalarios con personal experimentado, requieren el manejo de instrumental sofisticado y tienen un alto coste de inversión.^[4]

Actualmente el desarrollo de nuevas técnicas de fácil manejo y que permitan la obtención de resultados rápidos, que se adapten a laboratorios ambulantes, como son los biosensores electroquímicos, resultan una herramienta atractiva en el campo del análisis clínico.

1.2. Biosensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos han cobrado una enorme importancia en el ámbito del diagnóstico clínico gracias a las ventajas de portabilidad, bajo coste, alta sensibilidad y fácil interpretación.

Se trata de sistemas compactos de análisis que constan de dos partes integradas, un biorreceptor, que interacciona con el analito produciendo cambios físicos/químicos, y un elemento transductor que reconoce y transduce dicho cambio. Así en los biosensores electroquímicos, las reacciones de óxido/reducción producen cambios en las propiedades eléctricas (corriente, potencial) que son reconocidas por el transductor. ^[8]

En la última década, los avances en nanociencia han llevado al empleo e integración de un gran número de nanomateriales en el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos para el diagnóstico.

En este trabajo se ha desarrollado un magnetobiosensor electroquímico para la detección de la proteína IL-6, por tratarse de un tipo de instrumentación idónea para diagnóstico en puntos de atención primaria.

1.3. Nanopartículas magnéticas

La integración de las nanopartículas magnéticas (MNPs) en las estrategias bioanalíticas ofrece enormes ventajas en procesos de separación y concentración del analito, y facilita los lavados y la eliminación de la matriz gracias a su fácil manipulación mediante la aplicación de un campo magnético externo.

Las MNPs están formadas por un núcleo metálico y un recubrimiento polimérico cuya función es la estabilización, a la vez que aporta grupos funcionales para su posterior conjugación con moléculas biológicas.



Algunos materiales que se usan para la formación de los núcleos magnéticos son óxidos de hierro, cobalto, níquel o sus aleaciones. El comportamiento magnético de los materiales depende de cuantos electrones desapareados posee, del orbital en que se encuentren, del tamaño de la nanopartícula, configuración y tamaño de los dominios magnéticos, de la composición química y estequiometría, etc. [8]

En este trabajo, las MNPs se usarán como elemento de concentración/separación del analito de interés, así como soporte sólido para la inmovilización del analito sobre la superficie del electrodo.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo se centra en el desarrollo de un sistema biosensor para la determinación de Interleuquina 6 (IL-6) utilizando nanopartículas magnéticas modificadas.

Se pretende desarrollar una metodología analítica basada en el aislamiento de la proteína IL-6 de muestras biológicas mediante el uso de nanopartículas magnéticas sintetizadas y funcionalizadas durante el desarrollo de este trabajo con un anticuerpo específico para IL-6. La detección propuesta para dicho sistema es llevada a cabo mediante la marcación indirecta de la proteína utilizando, en primer lugar, un anticuerpo anti-IL-6 biotinilado y posteriormente, usando avidina/estreptavidina conjugada a una enzima rédox (marcación secundaria), que se une a la primera gracias a la interacción de alta afinidad biotina-avidina/estreptavidina. Se ha propuesto la evaluación de dos enzimas rédox como la fosfatasa alcalina (ALP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP) para su detección electroquímica. Así, un aumento de la señal electroquímica indicaría, por tanto, un aumento en la concentración de enzima rédox, y por ende, una mayor concentración de IL-6 en la muestra.

La **Figura 1** muestra, de forma esquemática, la estrategia de detección con los dos sistemas enzimáticos de marcación propuestos.

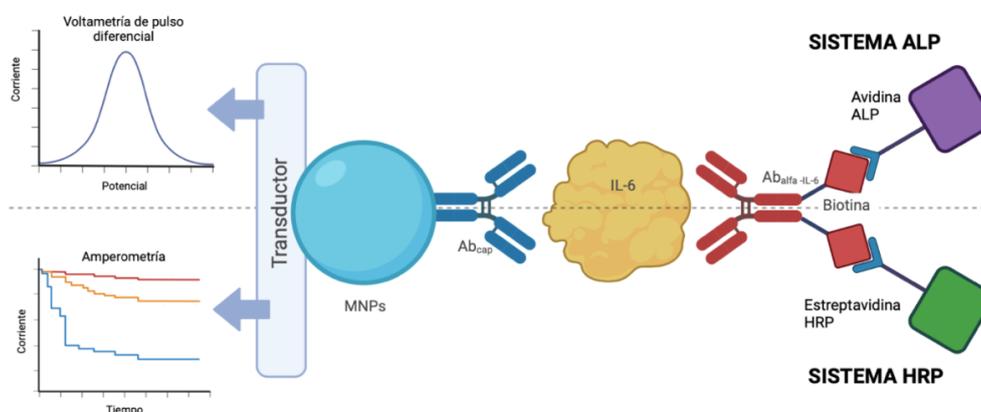


Figura 1. Representación esquemática de la estrategia de detección electroquímica de IL-6 empleando inmunoseparación magnética y marcación enzimática.

A continuación se enumeran los objetivos generales para el desarrollo de este trabajo:

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas magnéticas modificadas con GPTS (MNPs-GPTS).
- Biofuncionalizar las MNPs-GPTS con anticuerpos específicos para la proteína humana IL-6.



- Diseñar una estrategia de detección de la IL-6 utilizando MNPs-GPTS y marcación enzimática.
- Seleccionar el conjugado enzimático más adecuado para la determinación de IL-6.
- Optimizar distintos parámetros del inmunoensayo como pueden ser el volumen de muestra y el tiempo de incubación.
- Evaluar la capacidad de detección de la estrategia desarrollada.



3. MATERIALES

3.1. Reactivos biológicos.

1. Proteína recombinante IL-6 Humana (IL-6), (Abcam ab9627).
2. Anticuerpo monoclonal de ratón antiIL-6 de captura (Ab_{cap}), (Abcam ab9324)
3. Anticuerpo policlonal de conejo antiIL-6 con Biotina ($Ab_{\alpha-IL-6}$), Abcam ab8425).
4. Conjugado avidina-fosfatasa alcalina (Av-ALP)
5. Conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Estrep-HRP)

3.2. Tampones.

Los tampones utilizados en las distintas etapas del desarrollo del inmunosensor fueron preparados con agua ultrapura (milliQ) y la composición de los mismos se especifican en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Tampones usados para el desarrollo del TFG

Uso	Tampón	Variación
ALP	Tampón 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS)	<u>Incubación:</u> TRIS 0,1 M, $MgCl_2$ 1 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1%; pH= 7,2 <u>Lavados:</u> TRIS 0,1 M, $MgCl_2$ 1 mM, y Tween-20 al 0,05% (TRIS-Tween); pH=7,2 <u>Determinación enzimática:</u> TRIS 0,1 M, $MgCl_2$ 1 mM; pH=9
HRP	Tampón Fosfato Salino (PBS)	<u>Incubación:</u> PBS 10 mM, y BSA al 0,1%; pH= 7,4 <u>Lavados:</u> PBS 10 mM con Tween al 0,05%; pH=7,4
MEDIDA ELECTRO-QUÍMICA	Tampón Fosfato	PB 0,1M, KCl 0,1 M; pH=7

3.3. Reactivos químicos.

Los reactivos químicos utilizados en el desarrollo de este trabajo están descriptos en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Materiales usados en el TFG

Síntesis	Variación
MNPs	NaOH, Hidróxido sódico EMSURE® HCl, Ácido clorhídrico, reactivo ACS, 37%, Honeywell Fluka™ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Sulfato ferroso Heptahidratado, reactivo ACS, SIGMA® $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Cloruro de Hierro (III) Hexahidratado, Merck KGaA Etanol, reactivo ACS, EMSURE® Gas Nitrógeno 99,99 %. Alpha GAZ1.

4. MÉTODOS

4.1. Síntesis de las nanopartículas magnéticas (MNPs)

La síntesis de las MNPs se inicia disolviendo 1,62 g de FeCl_3 y 1,39 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de HCl (1,2 mM) en un baño de ultrasonidos y, posteriormente se transfiere a un embudo de decantación, donde es desoxigenada mediante corriente de N_2 (**Figura 2**, panel izquierdo).

Esta solución de hierro (previamente desoxigenada con N_2) es añadida gota a gota sobre una solución desoxigenada de 150 mL NaOH 1,25 M, a 80 °C en agitación. Una vez completada la adición, se la deja reaccionar durante 30 minutos.

Una vez finalizada la síntesis se decantan las partículas del líquido sobrenadante colocando un imán debajo del recipiente para retener las MNPs en la base del vaso de vidrio y se realizan 3 lavados con agua destilada y 2 lavados con etanol/agua hasta que el pH del sobrenadante sea aproximadamente 7.

Finalmente, las MNPs son secadas en estufa a 70 °C durante 24 horas y conservadas en un ambiente seco.



Figura 2. Izquierda: mezcla de ambas disoluciones bajo corriente de N_2 ; Derecha: magnetismo de las MNPs

4.2. Funcionalización de las MNPs

Las MNPs fueron recubiertas con un agente silanizante, el GPTS. Para ello, 100 mg de MNPs se dispersaron mediante ultrasonido en una disolución alcohólica al 5% de GPTS. Después de 30 minutos bajo ultrasonido, la reacción se mantuvo durante 5 horas con agitación mecánica. Posteriormente, las MNPs-GPTS fueron lavadas tres veces con una mezcla etanol/agua (1:1) haciendo uso de un imán para su retención sobre las paredes del mismo, y eliminando el sobrenadante. Finalmente, fueron secadas aproximadamente durante 12 horas en estufa a 60 °C. La **Figura 2**, panel derecho muestra el magnetismo de las MNPs-GPTS.

4.3. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

Los estudios de caracterización se realizaron en los servicios del SEGAI de la ULL. Los equipos usados para cada técnica de caracterización se detallan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Equipo utilizado en la caracterización de las MNPs

Técnica	Equipo
Difractograma de rayos X	Difractómetro Philips Panalytical X'Pert
Isotermas adsorción/desorción de nitrógeno	Analizador TriStar II (Micromeritics) (77,3 K)
Análisis termogravimétricos	Aparato Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA (25-700 °C en atmósfera de N ₂)
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	Espectrofotómetro Jasco FT/IR-620 0 IRT-5000

4.4. Biofuncionalización de las MNPs-GPTS con Ab_α-IL-6

Para la biofuncionalización se pesaron 10 mg de MNPs-GPTS y se resuspendieron en 495 μL de tampón PBS. A esta solución se le adicionó 5 μL de Ab_{cap} y se incubó en agitación durante 3 horas a 37 °C (**Figura 3**). Posteriormente fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con una solución de etanolamina 10% en tampón fosfato pH 7 para bloquear todos los grupos reactivos libres. Finalmente, las partículas modificadas MNPs-GPTS/IL-6 fueron resuspendidas en 500 μL de PBS (concentración 20 mg/mL).^[9]

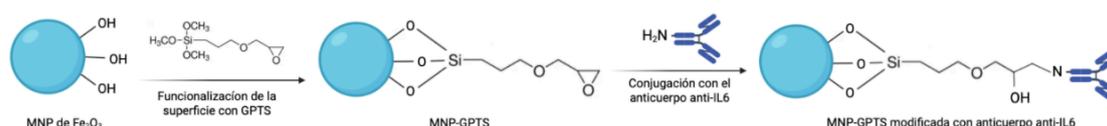


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia de biofuncionalización de las partículas magnéticas con anticuerpos específicos para IL-6.

4.5. Estrategia inmunomagnética para determinación de IL-6

Para la detección de IL-6 en tampón se utilizó 1mL de muestra para dicha determinación en tres etapas:

- 1 mL de muestra fue adicionado a un tubo tipo eppendorf que contenía 10 μL de MNP-GPTS/IL-6 (20 mg/mL) e incubado durante 45 minutos en agitación a 37 °C. En esta etapa se produce la inmunocaptura de la IL-6.

- b) La marcación primaria fue realizada con 100 μ L de 0,2 ng/mL del $Ab_{\alpha-IL-6}$ (preparado en tampón de incubación) e incubado durante 45 minutos en agitación a 37 °C.
- c) La marcación indirecta de la muestra utilizando el conjugado Estrep-HRP o Av-ALP fue preparada en tampón de incubación, cuya marcación se debe a la interacción de alta afinidad biotina-estreptavidina/avidina. La **Figura 4** muestra los distintos pasos y reactivos empleados en el inmunoensayo.

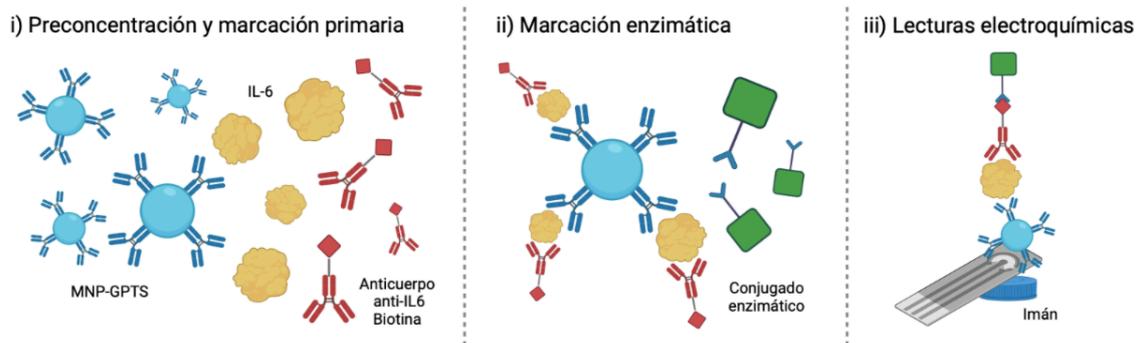


Figura 4. Representación de los distintos pasos de la inmunoestrategia desarrollada para la determinación de IL-6.

Luego de cada paso de incubación se realizaron 3 lavados con tampones de lavado suplementados con Tween-20 al 0,05% para eliminar todos los componentes remanentes de la muestra o el exceso de los reactivos de marcación sin reaccionar. Para ello, se colocan los viales en un separador magnético, de modo que las partículas magnéticas (unidas a la muestra) quedasen retenidas en la pared del vial (véase **Figura 5**). Así, la solución de reacción/lavado puede ser eliminada fácilmente con una micropipeta.

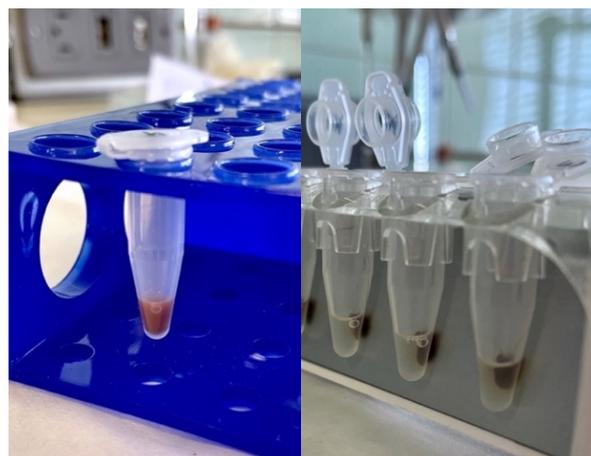


Figura 5. Izquierda MNPs resuspendidas en tampón; Derecha MNPs retenidas sobre la pared del vial mediante su inserción en un separador magnético.



Diferentes parámetros de la estrategia inmunomagnética han sido optimizados tales como el volumen de muestra analizado y el tiempo de incubación de los distintos pasos con el objetivo de simplificar la estrategia y aumentar la sensibilidad del ensayo. (Véase **Tabla 6**).

Tabla 6. Resumen de las estrategias de optimización

Optimización	Fundamento	Control negativo
Volúmenes de muestra	Se evaluaron distintos volúmenes iniciales de muestra (100, 250, 500 y 1000 μL) a una concentración de IL-6 de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, manteniendo constante la concentración de todos los demás reactivos	Muestras blanco sin IL-6 con volúmenes de 100 y 1000 ml.
Tiempos de incubación	Se estudió la posibilidad de disminuir el tiempo de incubación de los distintos pasos del ensayo pasando de 45 a 20 minutos de la incubación de la muestra y la marcación primaria, y reduciendo de 30 a 15 minutos la incubación con el conjugado enzimático	Muestras blanco sin IL-6 incubadas durante el tiempo inicial y el reducido

4.6. Medidas electroquímicas

Todas las medidas electroquímicas realizadas durante el desarrollo de este TFG fueron llevadas a cabo con un potenciostato/galvanostato (STAT 200, DropSens-Methrom).

Las medidas electroquímicas se realizaron sobre electrodos comerciales de carbono serigrafiados (SPCE) (DRP-110, DropSens). Estos electrodos tienen impresa una celda electroquímica completa compuesta por un electrodo de trabajo de carbono (4 mm de diámetro), un contraelectrodo de carbono y un pseudoelectrodo de referencia de Ag.

La determinación electroquímica de IL-6 fue realizada de la siguiente manera, dependiendo del conjugado enzimático utilizado en la marcación secundaria.

Determinación de la actividad de HRP mediante amperometría: La determinación de IL-6 utilizando como conjugado enzimático la Estrep-HRP fue realizada por amperometría. Los fundamentos de la medida amperométrica son descritos en el **Anexo 1**.

El procedimiento de medida amperométrico fue el siguiente: tras la estrategia inmunomagnética, la muestra es agregada sobre la superficie de un electrodo serigrafiado insertado en una plataforma que contiene un imán debajo de la zona del electrodo de trabajo, tal y como lo muestra la **Figura 6, A y B**.

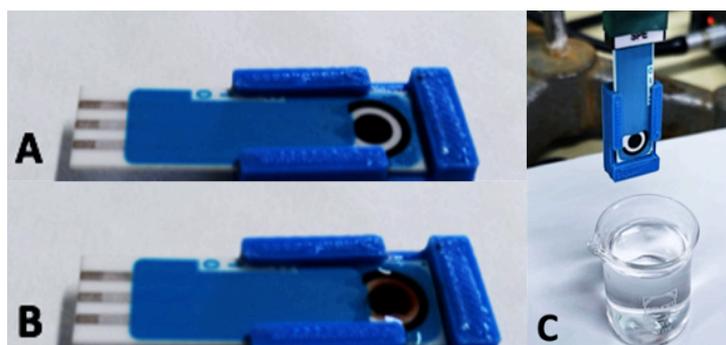


Figura 6. Plataforma imantada para la inmovilización de la muestra sobre la superficie del electrodo. (A) Electrodo comercial desnudo; (B) Electrodo comercial con MNPs sobre la superficie; (C) celda de medida.

Una vez que la muestra es inmovilizada sobre la superficie del electrodo, este es sumergido en un vaso conteniendo 10 mL de tampón de medida (véase **Figura 6, C**). La medida amperométrica fue realizada en agitación mecánica y mediante la aplicación de un potencial de -0.2 V para polarizar la superficie del electrodo, en donde se adiciona en primer lugar 100 μ L de hidroquinona 2,15 mM hasta que la corriente se estabiliza y posteriormente se añaden 500 μ L de H₂O₂ 2 mM.

Tabla 7. Parámetros usados en la Amperometría

Parámetros de la técnica electroanalítica		
Amperometría	Potencial aplicado	-0,200 V
	Límite de tiempo	900 seg
	Intervalo de muestreo	0,5 seg

Determinación de la actividad de la ALP mediante voltametría de pulso diferencial (DPV): La determinación de IL-6 utilizando como conjugado enzimático la Av-ALP fue realizada por DPV. Los fundamentos de la medida potenciométrica son descritos en el **Anexo 1**.

La medida de la ALP fue realizada utilizando 6 μ L de una solución de naftil fosfato 50 mM como sustrato en tampón Tris pH 9 (Concentración final de naftil fosfato 5 mM). La reacción es incubada durante 5 minutos.

La actividad enzimática es frenada mediante la transferencia de la solución de reacción a otro tubo. Para ello, el vial de reacción es colocado en el separador magnético, así el complejo MNPs/IL-6/ALP, es retenido sobre las paredes. Una vez transferido el sobrenadante, la ALP queda retenida sobre la pared del tubo de descarte.

El producto de reacción (α -naftol) es cuantificado vía electroquímica mediante la adición de 50 μ L del producto enzimático sobre el electrodo serigrafado



(véase **Figura 8**) y la aplicación de un barrido de potencial desde -0,15V hasta 0,6 V. Finalmente, la concentración de este producto de reacción será proporcional a las diferentes concentraciones IL-6 en la muestra.



Figura 7. Producto enzimático sobre electrodo serigrafiado

Tabla 8. Parámetros usados en la voltimetría de pulso diferencial

Parámetros de la técnica electroanalítica		
Voltimetría de pulso diferencial	Potencial paso (E_{step})	0,007 V
	(E_{pulso})	0,07 V
	Tiempo de pulso (t_{pulso})	50 ms
	Velocidad de barrido	0,05 V/s
	núm. scan	1
	Potencial de inicio	-0,15 V
	Potencial final	0,6 V



5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de las nanopartículas

Mediante la caracterización de las MNPs se obtuvieron resultados que mostraron la composición y características estructurales de las nanopartículas de óxido de hierro y las modificaciones superficiales que se produjeron tras su funcionalización con GPTS.

La correcta síntesis de las MNPs y sus posterior funcionalización se evaluó mediante diferentes técnicas como: XRD, FT-IR, TG/TDA y BET

La caracterización se describe con detalle en el **Anexo 2**.

5.2. Selección del sistema enzimático de marcación.

La selección del sistema enzimático más adecuado y que aporte mayor sensibilidad en la detección de IL-6 se realizó por comparación de la respuesta electroquímica obtenida cuando se utilizan HRP y ALP como enzima de marcación en la inmunoestrategia para la IL-6. Los ensayos se llevaron a cabo, en ambos casos, realizando la determinación de un control negativo y dos muestras con concentraciones distintas de IL-6 (0,5 y 0,05 $\mu\text{g/mL}$).

Las medidas de ambos sistemas son mostradas en la **Figura 14** y en la **Tabla 9**, junto con su representación de la relación señal/ruido para las dos concentraciones analizadas.

Tabla 9. Valores Señal/Blanco (S/B) para ambos sistemas enzimáticos

Señal/Blanco	Sistema de marcación	
	HRP	ALP
0,05 mg/mL	1,231	0,905
0,5 mg/mL	3,552	1,490

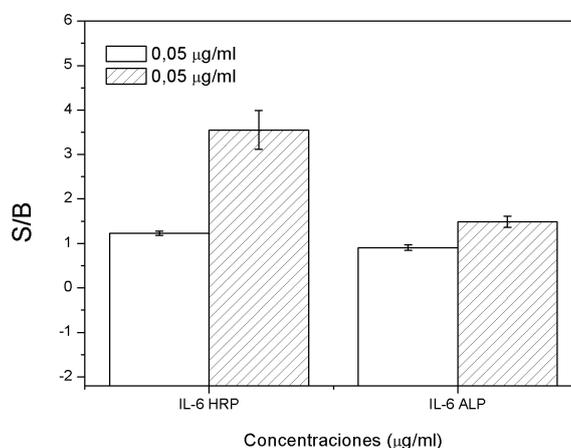


Figura 8. Resultados del Sistema ALP vs HRP.



Los resultados muestran que la marcación con el conjugado Estrep-HRP presentan mayor sensibilidad como puede observarse en los valores más elevados de S/B para ambas concentraciones analizadas (1,2 para 0,05 $\mu\text{g/ml}$ y 3,6 para 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Así, cuanto mayor es la relación S/B mayor es la capacidad del sistema para detectar la presencia del analito en la muestra. Por esta razón, todas las medias posteriores han sido realizadas utilizando como conjugado de marcación la Estrep-HRP.

5.3. Optimización del volúmenes de muestra

Para la selección de este parámetro se realizó la determinación electroquímica de la IL-6 a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ pero partiendo de distintos volúmenes de muestra inicial (desde 100 μL a 1000 μL).

Las medidas electroquímicas obtenidas para cada uno de los volúmenes son mostradas en la **Figura 9**.

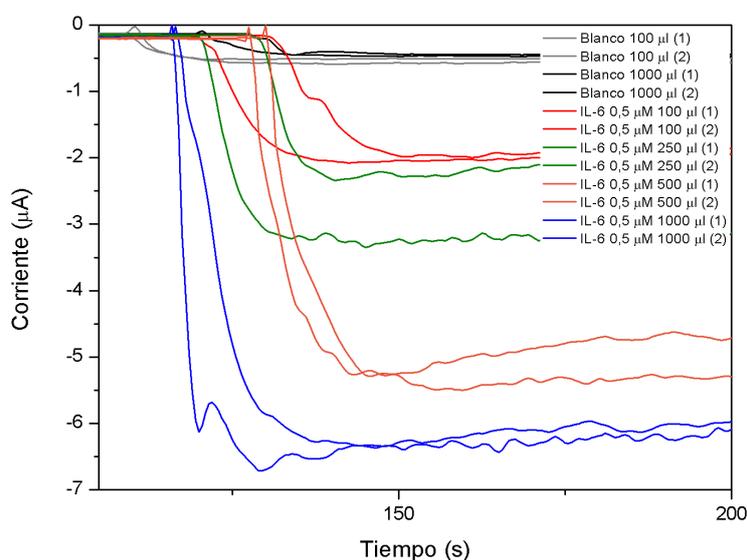


Figura 9. Curvas obtenidas midiendo diferentes volúmenes de muestra.

Tabla 10. Valores de corriente para diferentes volúmenes de muestra

	Volúmenes de muestra				
	Blanco 100- 1000 μl	IL-6 100 μl	IL-6 250 μl	IL-6 500 μl	IL-6 1000 μl
Corriente (μA)	0,317-0.376	1,810	2,495	5,111	6,157
Señal/Blanco (S/B)		5,2	7,2	14,8	17,8

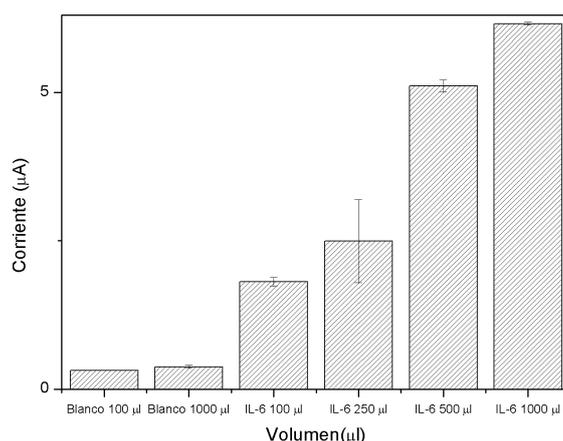


Figura 10. Gráfica de barras para los diferentes volúmenes de muestra.

Los resultados obtenidos son mostrados en la **Tabla 10** y **Figura 16**, donde se representa la señal electroquímica vs. el volumen de muestra analizado. A medida que aumenta el volumen de muestra, aumenta la señal electroquímica, aumentando la sensibilidad de la estrategia, tal y como queda plasmado con el aumento progresivo de la relación S/B. El rango de volúmenes se seleccionó de tal modo que 100 µL representaba la cantidad de muestra necesaria para un análisis de sangre capilar (pinchazo de la yema del dedo) y 1000 µL al volumen máximo para una determinación analítica particular. Con estos resultados, y considerando que 1 mL es un volumen adecuado para una determinación analítica, se selecciona esta cantidad como la cantidad de muestra utilizada para las determinaciones electroquímicas posteriores de IL-6 ya que ofrece un aumento considerable de la señal/sensibilidad.

5.4. Optimización del tiempo de incubación.

La evaluación de los tiempos y etapas de incubación es un paso importante durante la optimización de un bioensayo. Así, con el objetivo de reducir el tiempo total de análisis, se evaluaron dos tiempos de ensayo: a) Incubaciones con anticuerpos largas (45 minutos) e incubación del conjugado enzimático larga (30 minutos); y b) tiempos cortos de incubación con anticuerpos (20 minutos) y con el conjugado enzimático (15 minutos).

El objetivo de esta optimización es comprobar si la disminución de los tiempos de incubación afecta al porcentaje de captura de la muestra y la marcación de la misma o si son períodos suficientes de incubación.

Tabla 11. Valores de corriente para diferentes tiempo de incubación

	Tiempo de incubación	
	Incubaciones cortas	Incubaciones largas
Negativo (Blanco)	0,762 µA	0,855 µA
Positivo (0,05 µg/mL)	1,497 µA	1,919 µA
Señal/blanco (S/B)	2.0	2.2

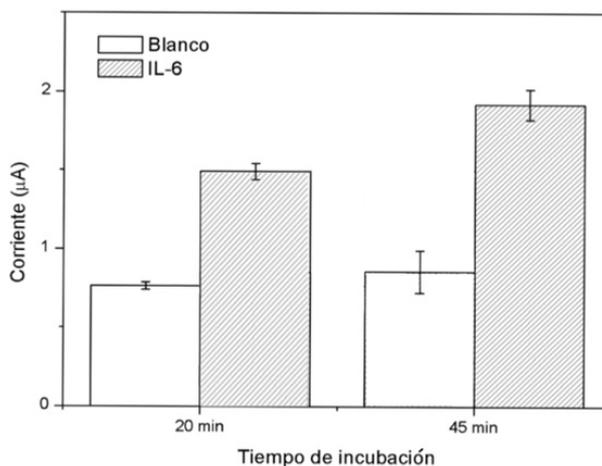


Figura 11. Gráfica de barras para los diferentes tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11** y **Figura 11**. A pesar de que se evidencia un valor de señal (corriente) mayor al incubar durante 45 minutos, incubando durante 20 minutos se detecta una señal coherente para el ensayo, mostrando casi la misma relación señal/blanco que cuando se realizan incubaciones prolongadas. Así, se demuestra que es factible reducir el tiempo de incubación del ensayo manteniendo la relación señal/ruido. Si bien el valor de la corriente se ve reducido con la reducción del tiempo de incubación, la separación entre los valores de control y muestra es suficiente para discriminar entre resultados positivos y negativos.

5.5. Curva de calibrado.

Para evaluar la capacidad de detección de IL-6 de la estrategia biosensora desarrollada se realizó la determinación electroquímica de muestras con diferentes concentraciones de IL-6 crecientes desde 0 a 2 $\mu\text{g/mL}$, manteniendo constante la concentración de todos los demás reactivos.

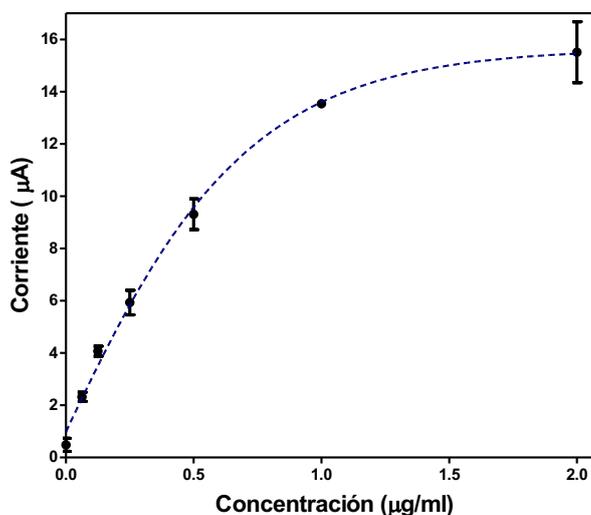


Figura 12. Curva de calibrado para diferentes concentraciones de IL-6.



Como se muestra en la **Figura 12**, el sensor mostró una buena correlación entre las concentraciones crecientes de muestra y las señales electroquímicas. La curva de calibración se ajustó utilizando una regresión asimétrica de cinco parámetros no lineal (R^2), cuyo valor es 0,9860.

El límite de detección (LOD) se estimó mediante la interpolación de la señal de los blancos utilizados en la curva de calibración mas tres veces la desviación estándar, siendo el valor resultante 0,027 $\mu\text{g/ml}$ para la proteína IL-6, con un error estándar de 0,003. Aunque el biosensor presenta una buena capacidad de detección entre diferentes concentraciones de IL-6, el LOD obtenido se encuentra alejado de los valores reales en la práctica clínica menores de 6 picogramos, lo que indica que se deben continuar las optimizaciones del ensayo para aumentar la sensibilidad o hacer cambios en la calibración de los electrodos.



6. CONCLUSIONES

En este trabajo se han sintetizado y caracterizado nanopartículas magnéticas cubiertas con GPTS, modificadas con anticuerpos específicos anti-IL6 para su integración en un bioensayo electroquímico y para la detección y seguimiento de los niveles de IL-6 en humanos.

El diagnóstico y seguimiento de los niveles de IL-6 es de gran utilidad para la elección de terapias en diferentes patologías inflamatorias como la artritis reumatoide. Por ejemplo, los tratamientos de artritis se inician con bloqueadores del TNF- α no siendo siempre el factor inflamatorio principal, lo que desemboca en un fracaso de la terapia y un cambio de la misma por un fármaco anti-IL-6. Diagnosticar desde el principio la causa principal de la enfermedad con un dispositivo como el biosensor desarrollado en este trabajo, permite el uso racional del fármaco y una mayor eficacia de las terapias dirigidas, lo que a su vez, puede disminuir el sufrimiento del paciente, mejorar su pronóstico y calidad de vida.

En este trabajo se ha demostrado, mediante diversas técnicas de caracterización, la adecuada síntesis, bioconjugación y la integración de las MNPs-GPTS/anti-IL-6 en una estrategia biosensora para la detección de la citoquina IL-6.

Las ventajas que aportan las MNPs a las estrategias diagnósticas son muchas, ya que hacer cambios en los componentes del sistema permite la detección de múltiples dianas. Además se puede integrar en otros ámbitos como la salud pública, las imágenes médicas o las terapias de reconocimiento celular, entre otros. En definitiva se trata de una herramienta versátil, de fácil manejo y económica que facilita el trabajo del operador y ofrece múltiples ventajas. En términos generales, el método desarrollado resulta útil para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias y la metodología desarrollada con estrategias electroquímicas pueden considerarse una herramienta ideal para formar parte de programas de control y seguimiento en entornos no hospitalarios. Esta técnica de detección es una alternativa interesante por su rápida respuesta y simplicidad de uso que puede ser útil en la atención primaria, pues resulta de fácil manejo y no precisa de personal altamente experimentado.

Perspectivas futuras: Los resultados preliminares mediante la evaluación del biosensor electroquímico han demostrado la capacidad potencial de la técnica desarrollada para la detección de distintos niveles de IL-6 en matrices líquidas de forma simple y utilizando instrumental sencillo y portátil. Sin embargo, se deberían realizar pruebas adicionales para mejorar y optimizar el biosensor en matrices biológicas como el estudio del efecto matriz utilizando suero humano en lugar de tampón para obtener resultados más realistas. Este tipo de prueba permite verificar la eficacia del biosensor en condiciones similares a la práctica clínica, aunque las señales suelen ser más débiles.



Por otro lado, los métodos desarrollados requieren de una validación mediante la comparación de los resultados con un método de referencia como podría ser la determinación de IL-6 mediante la técnica ELISA.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. IATREIA. 2011 [citado el 18 de marzo de 2023];24(2):pág. 157-166.
2. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Inmunología Basica, Studentconsult. En Espanol: Funciones y Trastornos del Sistema Inmunitario. 4a ed. Elsevier; 2014.
3. Sánchez JM, Sánchez PT, Peiró G, Sirera R, Lamo MD, Corbellas C, et al. Niveles séricos de IL-6 y depresión en varones con cáncer de pulmón no microcítico avanzado. 2013 [citado el 18 de marzo de 2023].
4. Barrientos-Arenas E, Henao-García V, Giraldo DM, Cardona MM, Urcuqui-Inchima S, Castaño JC, et al. Modulación de los niveles de lipoproteínas de alta densidad y las citoquinas IL-1 β e IL-6 en pacientes con dengue. Rev Peru Med Exp Salud Publica.
5. Jhoalmis S, Jenny GL. Correlación entre niveles de hormonas tiroideas y concentración sérica de interleucina 6 (il-6), proteína C reactiva (PCR) y lactato deshidrogenasa (LDH), en pacientes con diabetes tipo 2. Edu.co. [citado el 19 de marzo de 2023]
6. Arias Castellanos IA. Comparación de los niveles de SIgA e IgA total y específica de bacterias entéricas e interleucinas (IL-17, IL-21, IL-6) en pacientes con Artritis Reactiva y Espondiloartritis indiferenciada. Romero Sánchez MC, editor. Editorial Pontific
7. Liu B, Li M, Zhou Z, Guan X, Xiang Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? J Autoimmun. 2020 [citado 20 de marzo de 2023];111(102452):102452.
8. Martín Hernández M. Implementación y desarrollo de biosensores amperométricos en el ámbito biomédico [tesis doctoral]. La Laguna: Universidad; 2015.
9. Conde-Díaz A, Rodríguez-Ramos R, Socas-Rodríguez B, Salazar-Carballo PÁ, Rodríguez-Delgado MÁ. Application of polyaniline-based magnetic-dispersive-solid-phase microextraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the evaluation
10. Maltas E, Ozmen M. Spectrofluorometric and thermal gravimetric study on binding interaction of thiabendazole with hemoglobin on epoxy-functionalized magnetic nanoparticles. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl [Internet]. 2015;54:43–9.



11. Carinelli S, Fernández I, Luis González-Mora J, Salazar-Carballo PA. Hemoglobin-modified nanoparticles for electrochemical determination of haptoglobin: Application in bovine mastitis diagnosis. Microchem J [Internet]. 2022;179(107528):107528.
12. Martín M, Salazar P, Villalonga R, Campuzano S, Pingarrón JM, González-Mora JL. Preparation of core-shell Fe₃O₄@poly(dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor construction. J Mater Chem B Mater Biol Med [Internet]. 2014 [citado el 4 de abril de 2023]
13. Schneider P. Adsorption isotherms of microporous-mesoporous solids revisited. Appl Catal A Gen [Internet]. 1995;129(2):157–65.
14. Z.A. Alothman, A. Review, Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials, Materials 5 (2012) 2874–2902.

ANEXOS

Anexo 1. Fundamentos de la medida electroquímicas

Determinación de la actividad de HRP mediante amperometría: La determinación de IL-6 utilizando como conjugado enzimático la Estrep-HRP fue realizada por amperometría.

La amperometría se basa en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación (o reducción) de un compuesto electroactivo sobre la superficie del electrodo, al cual se le ha aplicado un potencial constante durante un tiempo determinado. La selección del potencial depende de la especie electroactiva y aporta cierta selectividad al ensayo.

La determinación de la actividad de la HRP por amperometría, se basa en el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato enzimático e hidroquinona (HQ) como mediador para transportar electrones entre el electrodo serigrafiado y la enzima HRP. El conjugado Estrep-HRP se utiliza como marcación enzimática, ya que se une a la IL-6 mediante la reacción con el $Ab_{\alpha-IL-6}$.

Una vez catalizada la reducción del H_2O_2 a H_2O con la consecuente oxidación de la hidroquinona (HQ) a benzoquinona (BQ), esta última es reducida sobre el electrodo mediante la aplicación de un potencial de reducción de -0.2 V. Así, la corriente medida es directamente proporcional a la concentración de HRP, en condiciones de saturación de su sustrato. Las reacciones redox que ocurren durante la determinación electroquímica son mostradas en la **Figura 1A**.

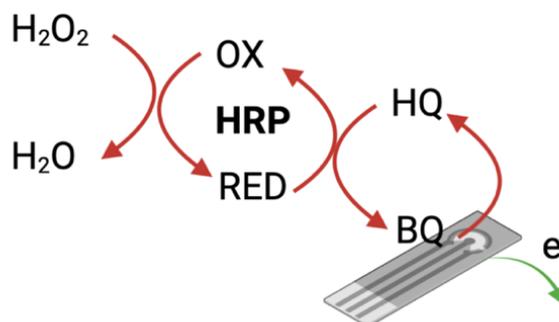


Figura 1A. Reacciones redox que tiene lugar durante la determinación electroquímica de la actividad de la HRP.

Determinación de la actividad de la ALP mediante voltametría de pulso diferencial (DPV): La determinación de IL-6 utilizando como conjugado enzimático la Av-ALP fue realizada por DPV.

Dicha técnica se basa en la aplicación de una serie de pulsos de voltaje regulares superpuestos al barrido lineal de potenciales. La corriente se mide antes y después de cada cambio de potencial y se representa la diferencia de corriente en función del potencial.



La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo, liberando fosfato al medio. En este trabajo, se utiliza α -naftil fosfato como sustrato que es hidrolizado a α -naftol, tal como muestra la ecuación 1. La actividad óptima de la enzima se consigue a pH alcalino. Las determinaciones de la actividad enzimática de la ALP no pueden realizarse en tampones fosfatos ya que los iones fosfatos actúan como un inhibidor competitivo de la enzima, uniéndose a su sitio activo y bloqueando la unión al sustrato. Por esta razón, cuando se utiliza esta enzima como marcación enzimática todas las incubaciones fueron realizadas en tampón Tris. El pH de las incubaciones fue de 7,2 para favorecer la formación del inmunocomplejo, mientras que el pH de medida de ALP es de 9, correspondiente al pH óptimo de la ALP.



Ecuación 1. Reacción de la enzima ALP.

Anexo 2. Caracterización de nanopartículas.

Las nanopartículas de óxido de hierro (MNPs) se sintetizaron mediante el método de coprecipitación química [9] y fueron funcionalizadas con (3-glicidoxipropil) trimetoxisilano (GPTS). Dicha funcionalización fue necesaria para la inmovilización covalente del Ab_{cap}. Cabe indicar que dichas técnicas de funcionalización (*grafting*: “injerto”) e inmovilización covalente mediante el uso de grupos epóxidos son técnicas ampliamente utilizada en la investigación y desarrollo de biosensores y sistemas de diagnóstico in vitro. [10]

Una vez funcionalizada la superficie del soporte (MNPs), el Ab_{cap} se une a los grupos epóxidos expuestos en la superficie de la nanopartícula, por la formación de un enlace covalente entre el grupo epóxido y restos aminos en la región pesada del anticuerpo. Este proceso de inmovilización permite que los anticuerpos se adhieran de manera estable y duradera al material de soporte, lo que aumenta la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de diagnóstico y mejora la eficacia de los biosensores.

La correcta síntesis de las MNPs y sus posteriores modificaciones se evaluó mediante diferentes técnicas como: XRD, FT-IR, TG/TDA y BET.

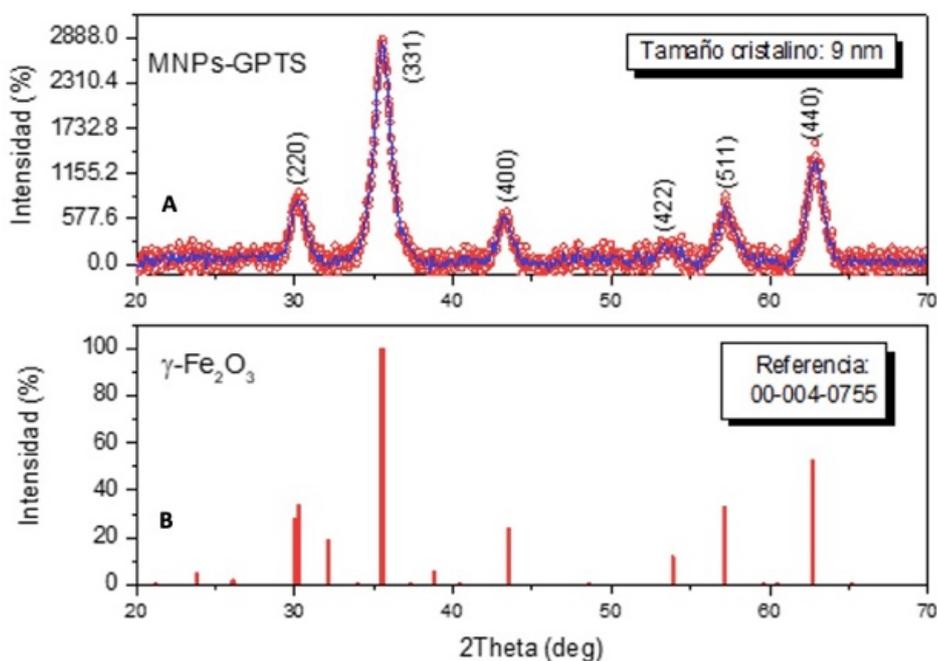


Figura 2A. (A) Difractograma experimental de las MNPs-GPTS; (B) Referencia para la fase maghemita.



La **Figura 2A,A** muestra el difractograma de las MNPs-GPTS experimental. De acuerdo con las líneas de difracción, marcadamente anchas, podemos asegurar que nuestras MNPs tienen tamaño en el orden nanométrico, asegurando que el soporte de reacción tenga propiedades superparamagnéticas (solo poseen propiedades magnéticas en presencia de un imán). Los picos de difracción a $30,3^\circ$, $35,5^\circ$, $43,4^\circ$, $53,6^\circ$, $57,4^\circ$ y $62,7^\circ$ se asignaron a las reflexiones de Bragg (220), (311), (400), (442), (551) y (440), respectivamente. Este patrón confirmó la naturaleza policristalina de las MNPs con estructura de espínela cúbica. [11].

El color rojizo del material y el difractograma obtenido sugieren que la composición de fase de las nanopartículas era maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (véase **Figura 2A,B**). El tamaño cristalino se calculó usando la ecuación de Debye-Scherrer y la anchura de la línea (331), presentando un valor de aproximadamente 9 nm. [12] La correcta funcionalización de las nanopartículas fue estudiada mediante espectroscopía FT-IR. La **Figura 3A** muestra los espectros IR para las nanopartículas no modificadas (MNPs) y funcionalizadas con GPTS. El marcado pico de absorción cerca de 580 cm^{-1} fue atribuido a las vibraciones de estiramiento de Fe-O de las MNPs, y es visible también para las MNPs-GPTS. Por otro lado, la aparición de señales de estiramiento, atribuidas a diferentes grupos funcionales tales como $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, C-C, C-H C-O, y las señales de vibración de los grupos Si-O- CH_3 y el grupo epóxido confirmaron la funcionalización exitosa de las MNPs con GPTS.

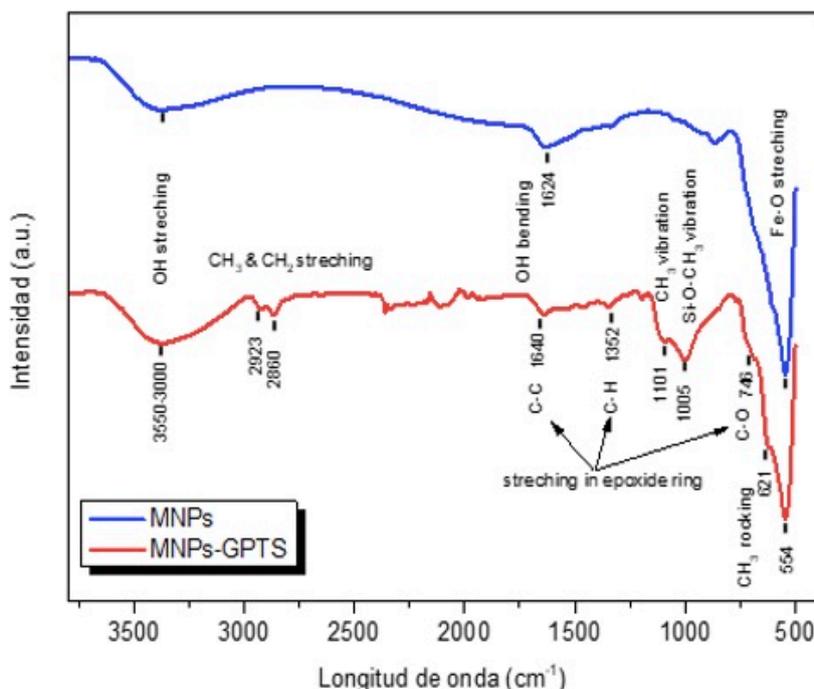


Figura 3A. Espectro de infrarrojo para las MNPs sin modificar y las MNPs-GPTS.

El área superficial específica y el tamaño de poro de las MNPs-GPTS fueron estudiados mediante análisis de las isothermas adsorción-desorción de N_2 . La **Figura 4A** muestra que la isoterma de adsorción-desorción experimental se corresponde a una isoterma tipo IV, según la clasificación de la IUPAC. [13] Dicha isoterma se caracteriza por una parte inicial bastante plana y corresponde a la adsorción monocapa/multicapa de las moléculas de N_2 . Por otro lado, el ciclo de histéresis (a una presión más alta) se atribuye a la condensación gaseosa y relleno de los capilares/poros. Dicho comportamiento confirmó la naturaleza mesoporosa de nuestro material. A partir de las curvas experimentales se calcularon el área superficial y la distribución de tamaño de poro usando los métodos estándares: (1) Brunauer-Emmett-Teller (BET) y (2) Barrett-Joyner-Halenda (BJH). [14] Finalmente, las MNPs-GPTS presentaron una superficie BET de $119,4 \text{ m}^2/\text{g}$ y un tamaño medio de poro de aprox. $9,3 \text{ nm}$.

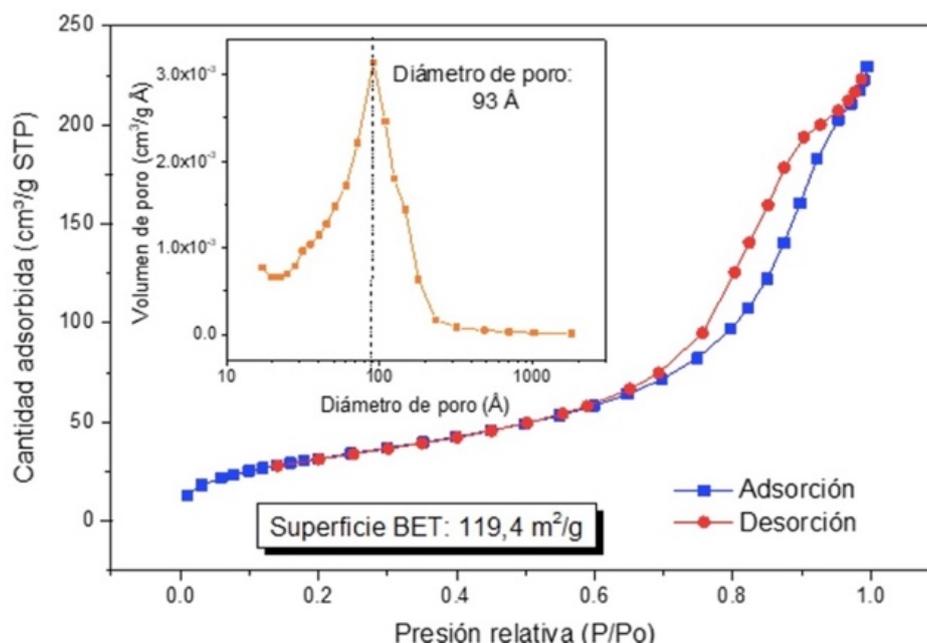


Figura 4A. Isoterma de adsorción-desorción de N_2 de las MNPs-GPTS.

La funcionalización química con GPTS y la estabilidad térmica de las nanopartículas se estudiaron mediante análisis termogravimétrico (TG/DTA). El estudio termogravimétrico se realizó en atmósfera de nitrógeno usando una rampa térmica con velocidad constante de calentamiento ($10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). La **Figura 5A** muestra la pérdida de peso tanto para las MNPs no modificadas y las MNPs-GPTS. El termograma para las MNPs (línea naranja) presentó un 5% de peso en el rango de temperaturas de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a $350 \text{ }^\circ\text{C}$ atribuido a la pérdida de agua (adsorbida en la superficie) y restos $-\text{OH}$ superficiales. A temperaturas más altas, no se observaron cambios de peso significativos. El termograma las



MNPs-GPTS (línea violeta) mostró un comportamiento térmico más complejo debido al componente orgánico, presentando diferentes cambios abruptos relacionados con la descomposición térmica de agente silanizante. [10]

La pequeña diferencia de peso (5%) obtenida a altas temperaturas (700 °C) entre ambos compuestos confirmó la presencia del modificador e indican que las moléculas han modificado ligeramente la superficie (grafting) de las nanopartículas e introducido los grupos funcionales epoxi necesarios para la etapa de biofuncionalización (inmovilización del Ab_{cap}).

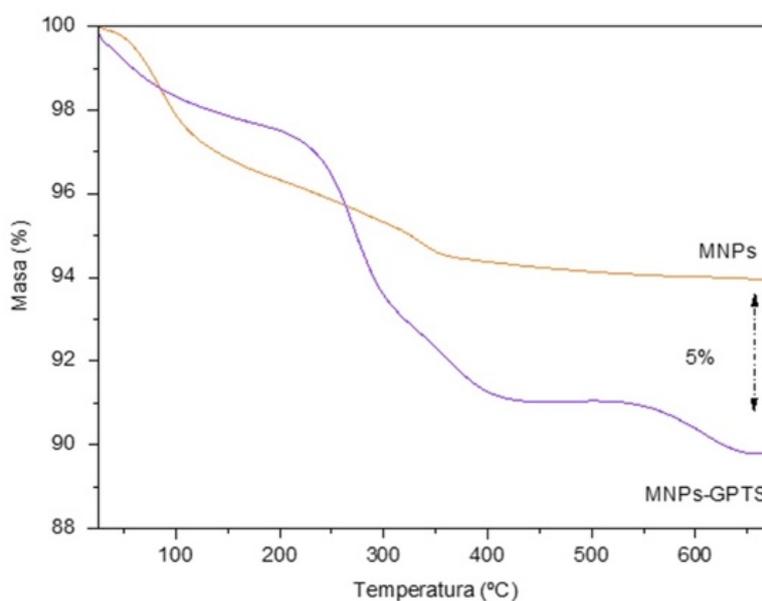


Figura 5A. Análisis termogravimétrico de las MNPs.