

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE INFECCIONES EN HERIDAS CRÓNICAS. USO DE NANOCANALES COMO PLATAFORMA

Celia Toyos-Rodríguez^a, Alba Iglesias-Mayor^a, Olaya Amor-Gutiérrez^a, Arnau Bassegoda^b, Tzanko Tzanov^b, Alfredo de la Escosura-Muñiz^{a,c*}

^a Grupo NanoBioAnalysis-Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, Oviedo.

^b Grup de Biotecnologia Molecular i Industrial, Departamento de ingeniería química, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa.

^c Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo.

INTRODUCCIÓN

Tras la aparición de una herida, se inicia un proceso de reparación epidérmica cutánea para recomponer el tejido dañado y restaurar su integridad, un proceso que puede tardar apenas unos días en una persona sana.

Sin embargo, este proceso puede detenerse y dejar de progresar de una forma ordenada, llegando a tardar meses o incluso años en curar completamente. Esto es lo que se denomina herida crónica [1].

Las heridas crónicas son un problema prevalente en la población de edad avanzada, en la que la comorbilidad asociada a procesos inflamatorios y la incidencia de patologías como la diabetes, la obesidad u otras enfermedades vasculares, hacen que la cronicidad de estas heridas aumente notablemente.

Actualmente, las heridas crónicas representan un importante desafío en los países desarrollados, afectando de forma silenciosa a entre un 1-2% de la población.

La infección de estas heridas es la mayor complicación que surge en el proceso de curación, y uno de los principales causantes del aumento del tiempo de hospitalización requerido por los pacientes.

El diagnóstico precoz de la infección sigue siendo un reto para los profesionales sanitarios, que no disponen de herramientas rápidas y sensibles para ello.

Pero para conocer el estado de una herida, es necesario determinar si esta está o no infectada. Este proceso se lleva a cabo actualmente mediante técnicas de cultivo microbiológico, las cuales requieren de un largo tiempo para proporcionar un resultado fiable [2]. Un tiempo del que muchas veces no se dispone, lo que conlleva a una administración deficiente de compuestos antimicrobianos para atajar la infección. Esta práctica es la causante de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, considerada como una de las mayores amenazas para la salud mundial.

La sustitución de las actuales técnicas de detección basadas en cultivo microbiológico por técnicas más rápidas, como la detección de biomarcadores relacionados con la infección, se presenta como una alternativa más rápida y ventajosa.

Ejemplo de ello son los enzimas, potentes biomarcadores cuyos niveles se encuentran elevados en los exudados de pacientes con heridas crónicas.

Entre las enzimas biomarcadoras de infección se encuentran la elastasa de neutrófilos humanos, la catepsina G, la mieloperoxidasa, la hialuronidasa [3,4] y la lisozima (Lys).

La Lys es de especial relevancia, ya que es producida exclusivamente por el sistema inmunitario humano como defensa. La Lys es una enzima glicosidasa capaz de hidrolizar el peptidoglicano (PG), el principal componente de la pared celular bacteriana.

La mayoría de los métodos actualmente disponibles para el análisis de la actividad de la Lys, se basan en su acción lítica contra la pared celular del microorganismo *Micrococcus luteus*, tomando como señal analítica la disminución de la turbidez a una longitud de onda de 450 nm [5]. Sin embargo, estos métodos son laboriosos y requieren pasos adicionales de separación.

Los inmunoensayos enzimáticos de tipo ELISA también se presentan como una alternativa, aunque su alto coste y complejidad experimental hacen que su implementación en el punto de atención sea poco eficiente.

Para superar estos inconvenientes, los biosensores han surgido como una alternativa rápida y de bajo coste que permite reducir el tiempo de diagnóstico y facilitar la administración eficaz del tratamiento.

LOS NANOCANALES COMO PLATAFORMA SENSORA

Los materiales nanoporos han surgido en la última década como componentes con una potente capacidad analítica para aplicaciones de biosensado [6]. Basados en los canales iónicos proteicos existentes en la naturales, los nanocanales se constituyen como sistemas artificiales eléctricos que, tanto a través de un nanoporo único como a través de la combinación de múltiples nanocanales, sirven de plataforma altamente eficiente para la detección de una gran variedad de analitos.

Aunque se han desarrollado diferentes estrategias para la fabricación de matrices de nanocanales, la dificultad de medir simultáneamente la corriente iónica en un elevado número de estos abrió el camino al desarrollo de múltiples plataformas basadas en membranas nanoporosas.

Las membranas nanoporosas de alúmina destacan entre la variedad de materiales nanoporosos utilizados para este fin, debido a sus propiedades estructurales únicas, como el pequeño diámetro y alta densidad de poros, así como su fácil funcionalización.

En combinación con sistemas de detección electroquímica, estas membranas se han utilizados en los últimos años para la detección de múltiples analitos.

Estos sensores se basan en la detección de variaciones en la intensidad de corriente registrada por el paso de una sustancia indicadora a través del nanocanal, las cuales provocan un bloqueo de este y, consecuentemente, de la señal analítica.

Para generar esta situación de bloqueo, se lleva a cabo la captura en su interior del analito de interés, a través de su reconocimiento selectivo mediante anticuerpos o aptámeros. En presencia de este analito, el paso de la sustancia indicadora se ve impedido, lo que produce una disminución de la corriente registrada. Este descenso de la señal es proporcional a la concentración de analito, permitiendo así su detección.

Pero el bloqueo de la señal analítica no es la única estrategia posible en el empleo de nanocanales.

Una estrategia basada en la situación opuesta, consistente en el desbloqueo del canal mediante la acción del analito de interés, ha sido empleada con éxito en este trabajo para la detección de la Lys, enzima biomarcadora de infecciones [7].

DETECCIÓN DE LISOZIMA (Lys) MEDIANTE UN BIOSENSOR BASADO EN NANOCANALES

En este trabajo, se ha desarrollado una novedosa metodología basada en el uso de membranas nanoporosas de alúmina y electrodos de óxido de indio y estaño sobre láminas de poli(tereftalato de etileno) (ITO/PET), para la monitorización de la Lys (Figura 1).

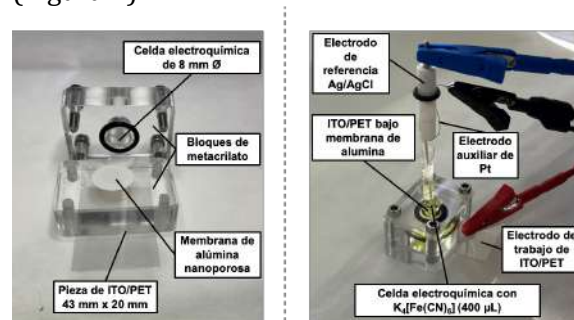


Figura 1. Imagen de la plataforma sensora empleada y sus componentes.

Para ello, el PG, sustrato de la Lys, se inmoviliza en las paredes interiores de los nanocanales, bloqueándolos. En presencia de la Lys, el PG se degrada específicamente, produciendo el desbloqueo de los mismos (Figura 2).

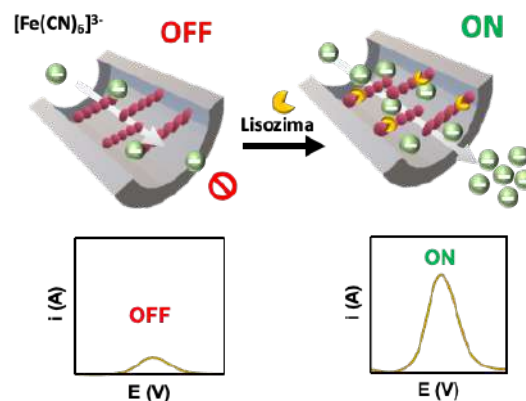


Figura 2. Esquema del principio del sensor desarrollado.

En la detección de biomarcadores mediante membranas nanoporosas de alúmina, hay dos factores que influyen directamente sobre el bloqueo conseguido: la carga del biomarcador (bloqueo electrostático) y su tamaño, así como el diámetro del canal (bloqueo estérico).

Es por ello que, en este trabajo se han investigado los parámetros implicados en estos dos tipos de bloqueos, consiguiendo su optimización.

Para el estudio del bloqueo electrostático, se evaluó cómo el pH de la solución de medida

empleada afecta al bloqueo conseguido. Esta relación se debe a que, en función del pH, la carga que presentan los componentes biológicos inmovilizados en el interior del canal varía. En este caso, fue la carga del PG la que se optimizó, teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de este péptido (pI 6.5) y la carga de la sustancia indicadora, en este caso el ferricianuro (cargado negativamente). A un pH inferior al pI (pH 4.6), el peptidoglicano se encuentra cargado positivamente, lo que provoca una atracción de las cargas, favoreciendo su llegada al electrodo y, por tanto, generando un aumento de la intensidad de corriente. Sin embargo, cuando el pH es superior al pI (pH 7.2), el péptido se encuentra cargado negativamente, por lo que la repulsión entre sus cargas y las de la sustancia indicadora, favorecen un aumento del bloqueo.

Por otro lado, el bloqueo estérico se optimizó a través de la evaluación de membranas nanoporosas con diferentes tamaños de poro en el rango de 20 a 200 nm. A través de esta prueba se pudo corroborar cómo cuanto menor es el tamaño de poro, mayor es el bloqueo estérico, sin llegar a observarse inespecificidades en el proceso de medida. Una vez optimizado el bloqueo, se pasó a la detección de la enzima Lys (Figura 3).

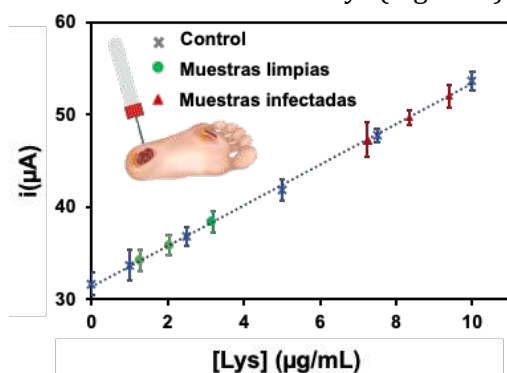


Figura 3. Curva de calibrado obtenida para la detección de Lys.

Este método analítico permitió detectar este biomarcador a niveles de 280 ng/mL, comparables con los proporcionados por métodos analíticos de referencia.

Dadas las extraordinarias propiedades de filtrado de las membranas nanoporosas de alúmina, se analizaron exudados de heridas de pacientes con úlceras tanto estériles como infectadas, sin necesidad de ningún tratamiento previo de la muestra. Las señales obtenidas, permiten discriminar claramente entre los niveles de Lys estimados en las muestras infectadas, respecto a

las que no lo están (Figura 3). Esta tecnología nos acerca a un análisis rápido y descentralizado de las infecciones en heridas crónicas, ayudando a reducir costes y, sobre todo, a salvar vidas.

CONCLUSIONES

El uso de nanocanales como plataformas sensoras, en múltiples formatos, ha sido creciente en los últimos años.

Entre estas plataformas destacan las membranas nanoporosas de alúmina que, dada su versatilidad y fácil funcionalización favorecen su uso en aplicaciones de biosensado. Sin embargo, su uso pasa por la optimización del bloqueo conseguido, especialmente el bloqueo electrostático. Simplemente a través del cambio del pH de la solución de medida utilizada este parámetro se puede regular y optimizar. En cuanto al bloqueo estérico, aunque la utilización de diámetros de poro reducido favorece este aspecto, la reducida variabilidad de tamaños de poro y espesores que presentan las membranas comerciales, deja campo todavía a la optimización del bloqueo electrostático de estas plataformas. Esta tecnología nos acerca a un análisis rápido y descentralizado que facilite la detección rápida de patologías como las infecciones en heridas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (MCI-21-PID2020-115204RB-I00 / PRE2018-084953 / RyC-2016-20299) y las Ayudas para Grupos de Investigación del Principado de Asturias (SV-PA-21-AYUD/2021/51323).

REFERENCIAS

- [1] Eming S.A. et al., *Sci. Transl. Med.* 2014. 6. 265sr6.
- [2] Dowset C. et al., *J. Wound Care* 2014. 23. 552-562.
- [3] Toyos-Rodríguez C. et al., *Biosens. Bioelectron.* 2022, 200, 113926
- [4] de la Escosura-Muñiz A. et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11 13140-13146
- [5] Hardt M. et al., *Anal. Biochem.* 2003 312, 73-76.
- [6] de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2016, 79, 134-150.
- [7] Iglesias-Mayor A. et al., *Biosens. Bioelectron.* 2022. 209. 114243