

JUNIO 2018 | TARRAGONA



FUNCIONALIZACIÓN DE ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE ORO PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DAVID PÉREZ MORA

Trabajo de final de grado
Tutorizado por el Dr. Lluís Masip Vernis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todo el equipo de Biosensors for Bioengineering por acogerme en su grupo de investigación. Especialmente, a los investigadores postdoctorales Alejandro Hernández y Maria Alejandra Ortega por todo el conocimiento y soporte que me han dado, al líder Javier Ramón Azcón, por darme la oportunidad de llevar a cabo las prácticas externas en su laboratorio, a Lluís Masip, por tutorizarme durante la realización del trabajo y a mi familia, por apoyarme en todo momento durante la carrera.

Índice

1. Datos del centro.....	3
2. Resumen	4
3. Introducción	5
3.1. Distrofia muscular miotónica	5
3.2. <i>Organ-on-a-chip</i>	6
3.3. Técnicas inmunoquímicas	7
3.4. Electrodo Serigrafiados.....	8
3.5. Técnicas electroquímicas	9
4. Objetivos	10
5. Materiales y métodos.....	10
5.1. Equipos.....	10
5.2. Tampones y soluciones	11
5.3. Reactivos e Inmunoreactivos	11
5.4. Estudio del efecto de diferentes métodos para la activación de los electrodos de oro	12
5.5. Estudio de diferentes reactivos para la formación de la SAM sobre los electrodos de oro ..	13
5.6. Biofuncionalización de los SPGE mediante la inmovilización de anticuerpos.....	13
5.7. Optimización de la etapa de bloqueo para la minimización de las adsorciones no específicas	14
6. Resultados y discusión	15
6.1. Limpieza y activación de los SPGEs	15
6.2. Caracterización de la SAM. Activación e inmovilización de los anticuerpos de captura.....	16
6.3. Evaluación del efecto de diferentes agentes de bloqueo sobre las adsorciones inespecíficas.	25
7. Conclusiones	28
8. Future work.....	28
9. Bibliografía	29
10. Webgrafía	31
11. Autoevaluación.....	32
12. Anexos	33
Anexo I. Información detallada de los electrodos serigrafiados de oro.....	34

1. Datos del centro

El centro donde se ha realizado las prácticas, de las cuales se ha realizado el trabajo de fin de grado, es el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), localizado en el Parc Científic de Barcelona (PCB) (Calle de Baldiri Reixac, 10-12, 08028 Barcelona). El grupo de investigación en el cual se ha llevado a cabo el trabajo es *Biosensors for Bioengineering*, liderado por el doctor Javier Ramón Azcón.

2. Resumen

La distrofia muscular miotónica es una enfermedad que causa debilitamiento muscular progresivo y dificultad para relajar el músculo cuando está contraído. Las personas que la padecen presentan niveles anormalmente elevados de IL-6 y TNF- α . La detección de estas citoquinas podría suponer un avance para el desarrollo de tratamientos preventivos para estos pacientes. Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un sistema inmunosensor de transducción electroquímica para la detección de estas citoquinas en muestras de músculo esquelético. Se describen los diferentes pasos de optimización para el desarrollo de este inmunosensor, el cual se basa en el uso de electrodos serigrafiados de oro. El principio de este es la elevada afinidad que presentan estas inmunoglobulinas por su correspondiente antígeno. La construcción del inmunoensayo consta de una monocapa autoensamblada o SAM, la inmovilización del anticuerpo mediante un paso previo de activación, el reconocimiento del analito o antígeno a detectar, la adición de un segundo anticuerpo anti-antígeno biotinilado y, finalmente, la adición del bioconjugado estreptavidina peroxidasa de rábano picante (SAv-HRP), enzima que produce la señal gracias a la adición del correspondiente sustrato.

Diversos diseños experimentales fueron desarrollados con la finalidad de optimizar los diferentes parámetros de la construcción del inmunoensayo, además del pretratamiento de los electrodos y el bloqueo de estos tras la inmovilización del anticuerpo, para eliminar posibles interacciones no específicas. El mejor método para pretratar los electrodos de oro fue el UV/O₃ *cleaner* durante 15 minutos. En referencia a la propia construcción del inmunoensayo, la configuración de la SAM y del bloqueo que dio mejores resultados fue mediante el uso del DTSSP 5 mM como SAM y el uso de BSA 1%, respectivamente. Por otro lado, los resultados mostraron que las uniones inespecíficas eran producidas principalmente por el anticuerpo biotinilado, con una pequeña contribución por parte del bioconjugado SAv-HRP.

Palabras clave: inmunosensores electroquímicos, electrodos serigrafiados de oro, voltametría cíclica, IL-6, TNF- α , pretratamiento, monocapa autoensamblada (SAM), adsorción inespecífica

3. Introducción

3.1. Distrofia muscular miotónica

La distrofia muscular miotónica (MMD, por sus siglas en inglés *Myotonic Muscular Dystrophy*) es una enfermedad rara que se caracteriza por el debilitamiento muscular progresivo y a dificultad para relajar el músculo una vez contraído. A menudo se conoce solamente por distrofia miotónica o enfermedad de Steinert, en honor al médico que la descubrió en 1909 (Asociación de la Distrofia Muscular, 2010). Es una condición que afecta a 1 de cada 8.000 personas mundialmente. Además de afectar al aparato muscular, también perjudica al sistema cardiovascular, al sistema nervioso central, al sistema digestivo, a las gónadas y al sistema ocular.

Esta enfermedad puede presentarse de dos maneras: la adulta y la congénita. La forma infantil es la más grave. Puede ocurrir en la descendencia a partir de adultos que tengan la MMD adulta. Esta condición tiene varios grados de severidad. Para algunas personas, los síntomas son leves y pueden llevar una vida normal. No obstante, para otras personas, la debilidad y el desgaste les imposibilita llevar a cabo actividades corrientes.

Hay dos tipos de distrofia miotónica: la MMD tipo 1 y la MMD tipo 2. Generalmente, la MMD2 es más leve que MMD1 (*Muscular Dystrophy Canada*, 2013).

El gen afectado en la MMD1 es el DMPK (proteína quinasa de distrofia miotónica), expresado en el cromosoma 19. Por otro lado, el gen afectado en la MMD2 es el ZNF9, el cual se encuentra en el cromosoma 3. La mutación causante de la enfermedad es una expansión de trinucleótidos. En el caso de la MMD1, hay una repetición de los nucleótidos CTG (citosina, timina, guanina) en el gen DMPK. Una persona sana normalmente tiene entre 5 y 37 repeticiones. En cambio, una persona afectada suele tener entre 50 y 2000 repeticiones (*Muscular Dystrophy Canada*, 2013).

Es una condición autosómica dominante. En muchos casos la mutación ocurre *de novo*. La descendencia de las personas afectadas tiene un 50% de posibilidades de padecer la enfermedad.

Los pacientes con distrofia miotónica presentan niveles anormalmente elevados de interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estos niveles están

asociados al estado de la enfermedad, así como a la arritmia cardíaca (Mammarella *et al.*, 2002; Schoser y Timchenko, 2010; Takahashi, Swanson y Nishino, 2017).

Actualmente no existe un tratamiento curativo de la distrofia miotónica. Solamente se trata para paliar los síntomas y mejorar la calidad de vida del paciente.

3.2. *Organ-on-a-chip*

Las metodologías que tienen el objetivo de testar fármacos contra diversas enfermedades dependen de la experimentación animal. Los resultados obtenidos se extrapolan al comportamiento de dichos fármacos en el cuerpo humano, aunque no siempre es comparable, ya que existen diferencias entre humanos y animales.

Un *organ-on-a-chip* es un dispositivo microfluídico para la cultivación de células vivas que mimetiza el microambiente y las funciones fisiológicas de los tejidos u órganos. Se emplea una red de canales microfluídicos para aportar de forma continua los nutrientes necesarios a dichos órganos o tejidos biomimetizados. Este sistema puede incorporar fuerzas físicas, como niveles fisiológicamente relevantes de tensión cortante de un fluido o compresión mecánica, analizando las respuestas del órgano simulado, incluyendo el reclutamiento de células inmunes circulantes, en reacción a fármacos, toxinas u otros factores ambientales (Bhatia y Ingber, 2014).

Una de las principales ventajas que aporta este tipo de dispositivos conocidos como *organ-on-a-chip*, es la posibilidad de biomimetizar el tejido u órgano objeto de estudio, evaluar el efecto frente a diferentes fármacos, pudiendo substituir la experimentación con animales. Además, permiten desarrollar diagnósticos y terapias más dirigidas.

Con el fin de realizar un seguimiento continuo del estado del tejido, los constructos 3D se pueden combinar con biosensores enfocados en la detección de determinados biomarcadores celulares como respuesta a diferentes estímulos externos.

Como se ha dicho anteriormente, particularmente en la MMD, los niveles de IL-6 y TNF- α son anormalmente elevados. Por este motivo, el trabajo descrito en esta memoria, tiene como objetivo desarrollar inmunosensores electroquímicos basados en el uso de electrodos serigraviados de oro, para la detección de las citoquinas determinadas. Una vez optimizados los diferentes parámetros del método de detección, se pretende integrar los biosensores desarrollados con el dispositivo *organ-on-a-chip*, mediante

canales de microfluídica, para realizar el seguimiento continuo de los diferentes niveles de dichos biomarcadores frente a determinados estímulos, tanto físicos como químicos.

3.3. Técnicas inmunoquímicas

Un inmunoensayo es un método bioanalítico que tiene como objetivo la detección y cuantificación de un analito específico, en este caso, IL-6 y TNF- α , y depende de la reacción de un antígeno y un anticuerpo. En algunos tipos de inmunoensayo se usa una molécula que actúa como marcador para la medición de la cantidad de analito, la cual provoca una reacción con el complejo inmune, obteniendo una señal. Esta señal se registra y se obtiene una respuesta determinada en función de la concentración del analito presente en la muestra analizada (Darwish, 2006).

Los inmunoensayos han sido usados en áreas farmacéuticas, como diagnósticos de enfermedades, monitorización de fármacos terapéuticos, farmacocinética clínica y en estudios equivalentes en *drug discovery* e industrias farmacéuticas (Darwish, 2006).

Hay dos tipos de formatos de inmunoensayos: competitivo y no competitivo (comúnmente llamado sándwich). El primero se usa para analitos con un peso molecular pequeño, requiriendo solamente un anticuerpo específico al analito. Por otra parte, el segundo, el cual ha sido el utilizado en este proyecto, se emplea para analitos con un peso molecular más elevado, como proteínas y péptidos. En este caso, se utilizan dos anticuerpos específicos para el analito (Dasgupta, 2016).

Los diferentes inmunoensayos desarrollados en este trabajo han sido en formato sándwich. En este método, un primer anticuerpo anti-antígeno se inmoviliza sobre la superficie de un pocillo. Posteriormente al tiempo de incubación determinado y al lavado, se añade el analito o antígeno. Repitiendo el proceso de lavado, se añade el segundo anticuerpo anti-antígeno marcado (en este caso, conjugado con biotina). Consecutivamente, se realiza otro lavado y se añade una molécula conjugada a la enzima que producirá la reacción enzimática. Particularmente en este estudio, se usa estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés *horseradish peroxidase*). La estreptavidina se caracteriza por su elevada afinidad por la biotina, pues la interacción no covalente entre estas es una de las más fuertes que se conocen (Liu, Zhang y Mei, 2016). Finalmente, después del lavado, se añade el sustrato

enzimático, el cual producirá una reacción enzimática, que dará lugar a una señal cuantificable (Aydin, 2015).

Concretamente en este proyecto, la plataforma empleada para llevar a cabo los inmunoensayos fue los electrodos serigrafiados de oro (SPGE, por sus siglas en inglés *screen-printed gold electrodes*), sobre los cuales se pueden inmovilizar de forma controlada, los anticuerpos encargados de capturar específicamente los biomarcadores presentes en la muestra, tal y como se muestra en la Figura 1.

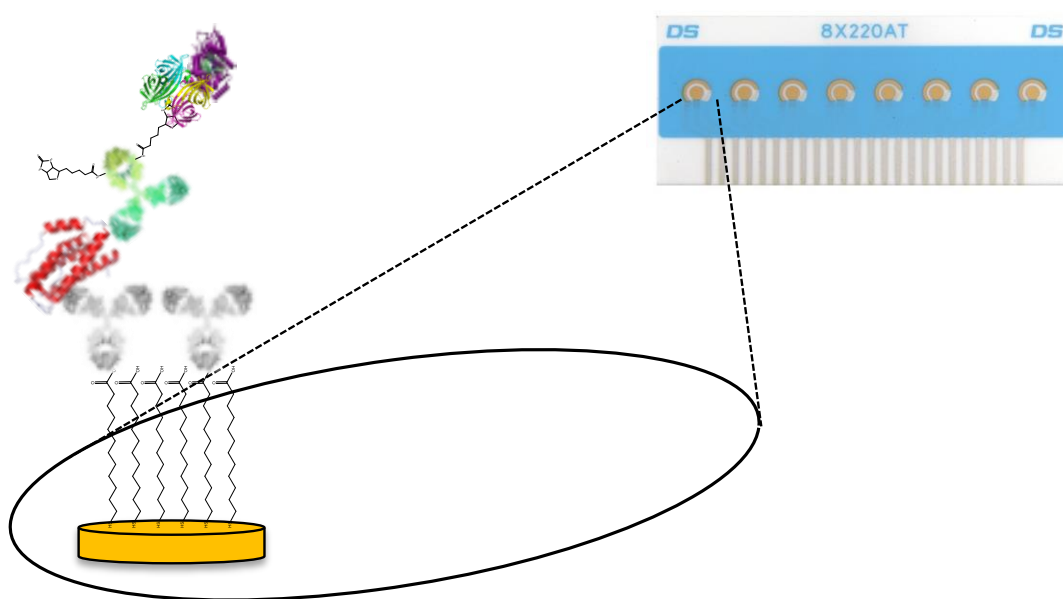


Figura 1. Esquema general del inmunosensor, donde puede verse como uno de los anticuerpos está inmovilizado sobre la superficie del electrodo de oro.

3.4. Electrodos Serigrafiados

La serigrafía o *screen-printing* es un método simple y rápido para el desarrollo, tanto de sensores, como de biosensores. Los biosensores basados en electrodos serigrafiados facilitan la detección y cuantificación de biomoléculas, antígenos, DNA, microorganismos y enzimas. Los electrodos serigrafiados son pequeños dispositivos fabricados en superficies plásticas o cerámicas. En estos dispositivos se encuentra integrado un circuito electrónico que conecta los electrodos con el sistema de medida (Taleat y Khoshroo, 2014).

Los electrodos serigrafiados (SPE, por sus siglas en inglés *screen-printed electrodes*) presentan diversas ventajas. En primer lugar, son transductores muy eficientes que permiten la integración de electrodos de referencia y de trabajo en el mismo chip. En segundo lugar, la construcción de estos electrodos tiene un coste reducido. En tercer

lugar, son dispositivos desechables, por su bajo coste, lo cual permite evitar ciertos problemas como la suciedad que se pueda depositar sobre los propios electrodos, o bien los productos de los procesos redox o la adsorción inespecífica. Por ello, este tipo de electrodos, capaces de transformar información biológica o química a una señal específica¹ (Taleat y Khoshroo, 2014), son una plataforma atractiva para la fabricación de biosensores electroquímicos.

3.5. Técnicas electroquímicas

Las diferentes etapas de funcionalización del sensor se han caracterizado mediante el uso de diferentes técnicas electroquímicas como la voltametría cíclica (CV, por sus siglas en inglés *cyclic voltammetry*) y detección amperométrica (AD, por sus siglas en inglés *amperometric detection*). Para estas mediciones, se usa un potenciostato conectado a un interfaz, donde se introducen las obleas con los electrodos de oro, controlado por un ordenador.

En el caso de la voltametría cíclica o ciclo voltametría, el potenciostato tiene el objetivo de controlar el potencial aplicado en el electrodo de trabajo. Dicho potencial se controla con un electrodo de referencia. El potencial es escaneado positivamente y acto seguido, negativamente, y de nuevo se escanea al potencial original, completando el ciclo. Se pueden aplicar uno o múltiples ciclos en una superficie. El voltamperograma resultante representa la corriente de respuesta del electrodo de trabajo al potencial de excitación aplicado. Dicho gráfico puede ser analizado para extraer información sobre la reacción redox (Rountree *et al.*, 2017).

En referencia a la detección amperométrica, es una técnica electroquímica, en la cual se aplica un potencial fijo al electrodo de trabajo, generando una corriente inicial. Cuando se introduce el sustrato, se produce la oxidación o reducción del propio sustrato electroactivo en la superficie del electrodo de trabajo. La diferencia de corriente, en este caso, es proporcional a la cantidad de analito presente. La conversión catalítica del sustrato es producido por la enzima HRP, la cual también es electroactiva (Kotanen *et al.*, 2012).

¹ Información extraída de *Sensors – Open Access Journal*. Link: http://www.mdpi.com/journal/sensors/special_issues/spe

4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado ha sido la biofuncionalización de electrodos de oro tipo *SPGE* mediante el uso de anticuerpos específicos para la detección de los biomarcadores celulares, interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en muestras de cultivo celular.

En base a este objetivo principal, las diferentes tareas que se han planteado han sido:

- Estudio de los diferentes protocolos de activación de superficies de oro.
- Funcionalización de los electrodos de oro para la inmovilización de anticuerpos específicos.
- Estudio de diferentes estrategias para la inmovilización de los anticuerpos específicos sobre los electrodos de oro.
- Caracterización de los electrodos biofuncionalizados.

5. Materiales y métodos

5.1. Equipos

Se han usado electrodos serigrafiados de oro formados por ocho celdas electroquímicas comprados en *DropSens* (Anexo I). Como se puede ver en la Figura 2a, la celda electroquímica consiste en el electrodo de trabajo (oro), de 2,56 mm de diámetro, el electrodo auxiliar (oro) y el electrodo de referencia (plata). Estos electrodos están comercializados en grupos de 20 y se han guardado a temperatura ambiente, protegidos de la luz y en un lugar seco.

En referencia al pretratamiento de los electrodos, se ha empleado el *UV Ozone Cleaner – ProCleaner™ Plus* y el *Expanded Plasma Cleaner PDC-002*.³

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo mediante el potenciostato μ Stat 8000P proporcionado por *DropSens* controlado por un ordenador. Las obleas se insertaban en

³ Para más información consultar en:

- *UV Ozone Cleaner – ProCleaner™ Plus*: <http://bioforcenano.com/product/uv-ozone-cleaner-procleaner-plus/>
- *Expanded Plasma Cleaner PDC-002*: http://ibecbarcelona.eu/wp-content/uploads/2015/01/ibec_corefacilities_plasma.pdf

el interfaz DRP-CAST8X proporcionado por *DropSens* (Figura 2b). La captura de datos se obtuvo mediante el programa *DropView 8400*.

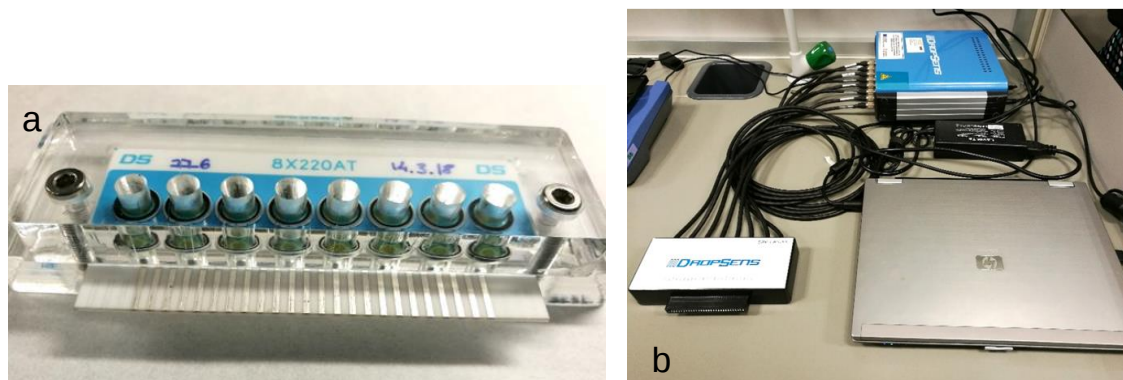


Figura 2. A) Electrodo serigrafiado de oro sujetados por una celda de polimetilmetacrilato (PMMA). **B)** Equipo para la detección amperométrica: potenciostato (arriba); interfaz (abajo izquierda); ordenador (abajo derecha).

5.2. Tampones y soluciones

Los tampones y soluciones usados fueron tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés *phosphate buffer saline*) 0,01 M a pH 7,5, tampón fosfato (PB, por sus siglas en inglés *phosphate buffer*) 0,01 M a pH 7,0, tampón fosfato salino con Tween 20 al 5% (PBST, por sus siglas en inglés *phosphate buffer saline with Tween 20*) 0,01 M a pH 7,5, tampón ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,1 M a pH 5,0 solución de tampón citrato 0,04 M y cloruro de potasio (KCl) 0,1 M a pH 5,5. El sustrato empleado para la detección amperométrica fue una solución constituida de 976 μL de tampón citrato 0,04 M y KCl 0,1 M (pH 5,5), 16 μL de 3, 3', 5, 5' - Tetrametilbencidina (TMB) 6 mg/mL y 8 μL de H_2O_2 1%.

5.3. Reactivos e Inmunoreactivos

El 11-MUA o ácido 11-mercaptoundecanoico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$) fue proporcionado por Sigma-Aldrich®, el alcanotiol terminado en ácido carboxílico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{EG})_6\text{OCH}_2\text{COOH}$), denominado en este proyecto como aPEG, fue proporcionado por ProChimia Surfaces y el ácido PEG-tiol ($\text{HS}(\text{EG})_7\text{CH}_2\text{COOH}$), denominado como cPEG, fue proporcionado por Polypure AS. El DTSSP (3, 3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) fue proporcionado por ThermoFisher Scientific™. El EDC (hidroclorito 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y el sNHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich®. El anticuerpo purificado producido en rata anti-IL-

6 y anti-TNF- α de ratón fue proporcionado por BD Pharmingen™. La albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés *bovine serum albumin*) y la etanolamina fueron proporcionadas por Sigma-Aldrich®. La leche desnatada en polvo fue comprada en un supermercado. La interleuquina-6 recombinante de ratón (rM-IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rM-TNF- α) fueron proporcionados por Shenandoah Biotechnology Inc™. El anticuerpo biotinilado anti-ratón IL-6 producido en rata fue proporcionado por BD Pharmingen™. La estreptavidina conjugada con peroxidasa fue proporcionada por ThermoFisher Scientific™. El ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) fue proporcionado por Sigma-Aldrich®.

5.4. Estudio del efecto de diferentes métodos para la activación de los electrodos de oro

Inicialmente, los electrodos se lavaron con H_2O Milli-Q y etanol. Seguidamente se secaron mediante corriente de N_2 . A continuación, se activó la superficie de los electrodos mediante el uso de tres metodologías distintas: ciclo voltametría cíclica en presencia de H_2SO_4 0,1 M, UV/ O_3 cleaner y Plasma Cleaner.

En el caso de la activación mediante H_2SO_4 0,1 M, se añadían 100 μL de esta solución por electrodo y se llevaba a cabo una voltametría cíclica desde un voltaje inicial de 0 V a un voltaje máximo de 1,6 V, a una velocidad de barrido de 0,1 V/s. Se realizaron 10 ciclos.

En referencia a la activación mediante UV/ O_3 cleaner, se introdujo la oblea en dicho equipo durante 15 minutos.

En cuanto al Plasma Cleaner, se introdujo la oblea en este equipo durante 2,5 minutos.

Seguidamente, con el fin de observar los efectos de la activación, se depositaron sobre los electrodos 100 μL de una disolución etanólica de 11-MUA, aPEG y cPEG. Los electrodos se sellaron y se protegieron de la luz, dejándolos en reposo durante toda la noche. A la mañana siguiente, los electrodos se lavaron con etanol y se secaron suavemente con corriente de N_2 . Seguidamente se adicionaron 40 μL de una disolución 5mM de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ en PB 5 mM pH 7.0, y se realizó una voltamperometría bajo las condiciones -0,1 – 0,6 V a una velocidad de barrido de 0,1 V/s, repitiendo el proceso 10 ciclos, con el fin de determinar qué método de activación favorecía la inmovilización de

la SAM. Finalmente, los datos fueron tratados por el software *DropView 8400* y *GraphPad Prism 5*.

5.5. Estudio de diferentes reactivos para la formación de la SAM sobre los electrodos de oro

Tras la activación de las superficies de oro, diferentes compuestos fueron estudiados para la formación de la SAM y posterior inmovilización de los anticuerpos. En este sentido, se depositaban 100 μL de solución etanólica de cada SAM (11-MUA, cPEG, aPEG) a diferentes concentraciones, 1, 5 y 10 mM, en electrodos diferentes. En el caso del DTSSP, se prepararon las mismas concentraciones en tampón citrato 5 mM pH 4,5. Los electrodos se cubrieron, se protegieron de la luz y se dejaron en reposo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron con etanol y agua Milli-Q con el fin de eliminar posibles moléculas no inmovilizadas sobre el oro, y fueron secados suavemente con corriente N_2 . Para el DTSSP, los lavados se realizaron con tampón citrato y seguidamente con agua Milli-Q. Finalmente, se evaluó el efecto de los diferentes compuestos a diferentes concentraciones mediante voltamperometría cíclica con 40 μL /electrodo de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM, tal y como se ha descrito anteriormente.

5.6. Biofuncionalización de los SPGE mediante la inmovilización de anticuerpos

Con el fin de inmovilizar los anticuerpos sobre la superficie del oro, los grupos carboxílicos terminales de los diferentes compuestos utilizados para la formación de la SAM (11-MUA, aPEG y cPEG), se activaron siguiendo la química de la carbodiimida. Brevemente, sobre cada electrodo se adicionaron 100 μL de la solución EDC 50 mM/sNHS 70 mM (1:1) preparada en tampón MES 0,1 M, pH 5,0 durante 45 minutos.

Posteriormente, los electrodos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS 10 mM, pH 7,5) y se añadían 50 μL del anticuerpo de captura, preparado en PBS 10 mM pH 7,0 durante 4 horas.

Para el caso de la SAM formada con DTSSP, no era necesario realizar un paso de activación, ya que el propio compuesto tiene un grupo N-hidroxisuccinimida terminal, capaz de reaccionar con los grupos amino primarios de los anticuerpos(Escamilla-gómez

et al., 2009). Posteriormente a la formación de la SAM y la etapa de lavado, se añadían 50 μL del anticuerpo de captura en solución con PB 10 mM pH 7,0.

Transcurrido ese tiempo, los electrodos biofuncionalizados se caracterizaron por voltamperometría cíclica mediante $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM, tal y como se ha descrito anteriormente.

De forma adicional y con el fin de confirmar la presencia de anticuerpo inmovilizado, se realizó una incubación con un anticuerpo secundario anti rata marcado con peroxidasa de rábano picante. Brevemente, tras lavar de nuevo los electrodos con PBS 10 mM y PB 10 mM en el caso del DTSSP, para eliminar posibles anticuerpos no inmovilizados, se adicionaron en cada electrodo 100 μL de anti rata IgG-HRP a una dilución 1/1000 preparada en PBS 10 mM pH 7,0. A continuación, se llevó a cabo una detección amperométrica a un potencial fijado de -0,2 V durante 500 segundos.

5.7. Optimización de la etapa de bloqueo para la minimización de las adsorciones no específicas

Tras la inmovilización del anticuerpo, con el fin de minimizar las adsorciones inespecíficas, se llevaron a cabo diferentes pruebas con diferentes controles (ver Figura 3) empleando diferentes agentes de bloqueo a diferentes concentraciones. Se testó albúmina de suero bovino (BSA) a 1 y 3%, etanolamina (EA) 0,1 y 1 M y leche a 1 y 3%. Para ello, posteriormente al paso de la inmovilización del anticuerpo y etapa de lavado, se adicionaron 100 μL a cada electrodo de la solución de bloqueo correspondiente y se dejaba reposar a temperatura ambiente durante toda la noche.

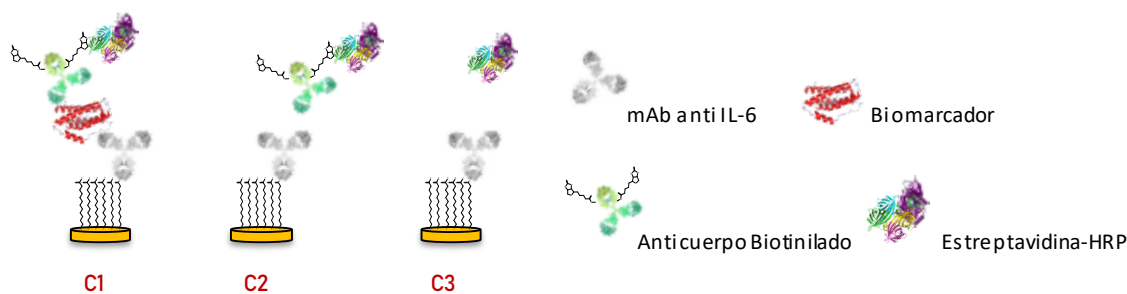


Figura 3. Controles realizados para determinar la procedencia de la adsorción inespecífica del inmunoensayo. C1, control que comprende todas las etapas del inmunoensayo. C2, control donde no se adiciona biomarcador, si no sólo PBS. C3, control donde tan sólo se añade el bioconjugado SAV-HRP, en el resto de etapas, solo PBS.

A la mañana siguiente, tras lavar de nuevo los electrodos con PBS 10 mM, se caracterizaban los electrodos por voltametría cíclica mediante $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM, tal y como se ha descrito anteriormente.

6. Resultados y discusión

6.1. Limpieza y activación de los SPGEs

Para obtener resultados satisfactorios, es necesario que se lleve a cabo un pretratamiento de los electrodos de oro. La formación de la SAM depende en gran parte de esta etapa.

Con la finalidad de comparar los diferentes métodos de limpieza y activación, se trató una oblea con cada uno de ellos y se realizó la formación de la SAM empleando los reactivos 11-MUA, aPEG y cPEG. La figura 4 muestra los diferentes perfiles obtenidos de voltametría cíclica mediante $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM de los tres métodos determinados y para cada SAM. Respecto a la CV correspondiente al electrodo desnudo, se observa que el método del UV/O_3 *cleaner* es el más efectivo, ya que los picos correspondientes al potencial redox del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de los electrodos modificados con SAM son significativamente más estrechos que los picos del electrodo desnudo. Esto significa que la superficie del electrodo se ha modificado, influyendo en los diferentes procesos de difusión de las especies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ y por lo tanto, cambiando el perfil de la CV. Por otra parte, los perfiles del método mediante H_2SO_4 0,1 M y el plasma muestran diferencias de corriente muy poco significativas respecto al electrodo desnudo. Esto evidencia que estos dos métodos no activan la superficie del oro de forma tan efectiva como el UV/O_3 *cleaner*, impidiendo la adsorción de la SAM sobre la superficie, y por lo tanto su modificación.

A la vista de estos resultados, se decidió realizar el pretratamiento de los electrodos serigrafiados de oro mediante UV/O_3 *cleaner*.

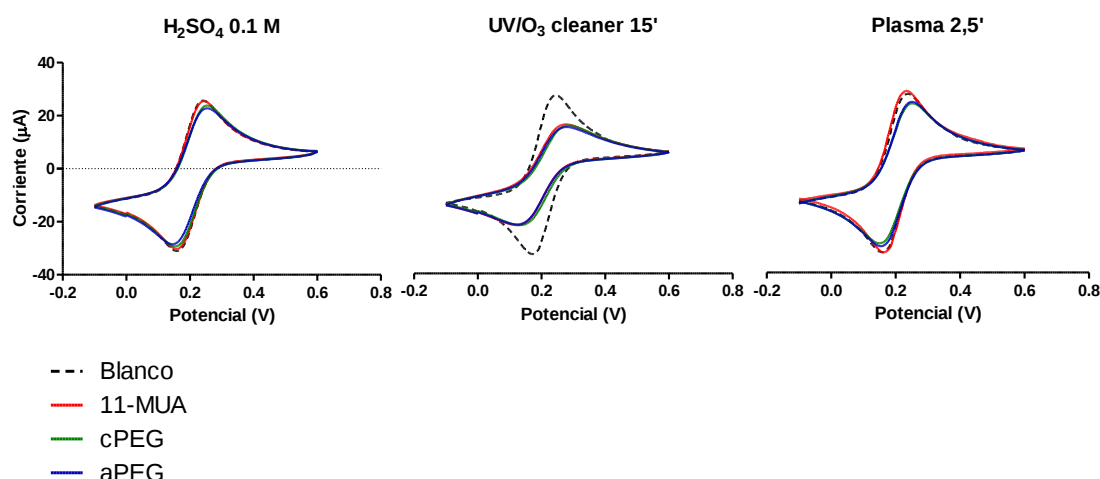


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos para cada uno de los métodos de pre-tratamiento de los electrodos y perfil de la CV tras la formación de la SAM con cada uno de los compuestos seleccionados..

6.2. Caracterización de la SAM. Activación e inmovilización de los anticuerpos de captura

La SAM (*self-assembled monolayer*) es un conjunto de moléculas que se ensamblan espontáneamente entre sí para formar una monocapa sobre la superficie. La estructura de las moléculas consisten en la cabeza, la cual se une a la superficie de oro, la cola, que se une con las otras cadenas para formar la monocapa mediante fuerzas de van der Waals y el grupo terminal, que proporciona un grupo funcional para la unión de otras moléculas. Las superficies de oro son buenas candidatas para el ensamblaje de las SAMs, ya que los alcanotioles tienen alta afinidad por este elemento, así como las propiedades inertes del oro (Safazadeh y Berron, 2015).

Se han testado cuatro diseños para la formación y caracterización de la SAM: el 11-MUA, el cPEG, el aPEG y el DTSSP, las estructuras de los cuales se observan en la figura 5.

En primer lugar, el 11-MUA permite la formación de SAM empaquetada de manera ordenada y proporciona un grupo carboxilo para ser modificado e inmovilizar proteínas de forma selectiva.

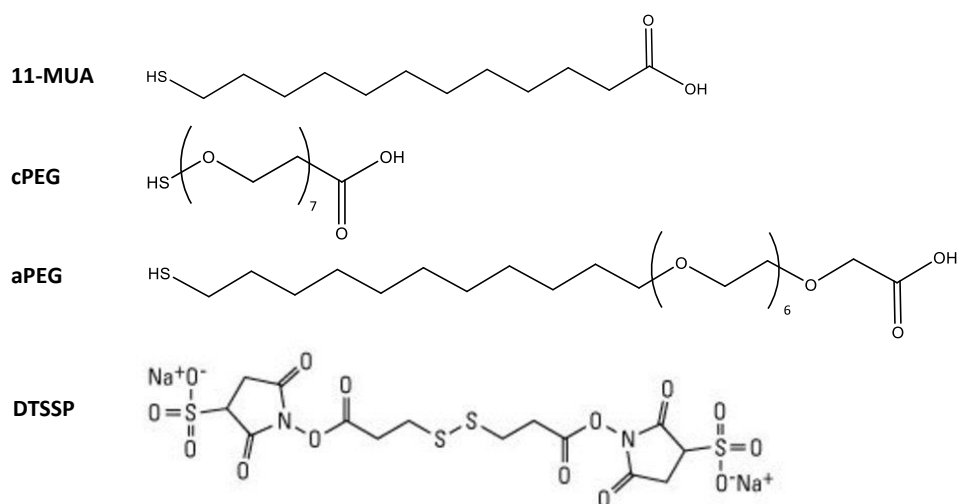


Figura 5. Estructura molecular del 11-MUA, cPEG, aPEG y DTSSP.

En segundo lugar, el cPEG se emplea para bioconjugación, *drug delivery*, hidrogeles, como *cross-linker* y en funcionalización de superficies. Es un polietileno carboxílico tiolado, heterobifuncional con grupos terminales de muy diferente reactividad. Es reactivo a aminas y tioles.⁴

En tercer lugar, el aPEG contiene un grupo tiol y un grupo carboxilo como grupos terminales. No obstante, también contiene una cadena alquílica de 11 carbonos. Las dos mitades de la molécula previenen la presencia de adsorciones inespecíficas (Sharma *et al.*, 2016).

Finalmente, el DTSSP es un reactivo soluble en agua, homobifuncional y brazo espaciador (*cross-linker*). Es reactivo hacia grupos funcionales amino. En rango de pH de 7 a 9, esta reacción es selectiva para grupos amino primarios, resultando en la formación de enlaces amida. El tampón fosfato salino (PBS) o el tampón fosfato (PB) se usan típicamente para reacciones donde interviene el DTSSP (Escamilla-gómez *et al.*, 2009).

La figura 6 muestra los voltamperogramas cíclicos del ensayo redox mediante [Fe(CN)₆]³⁻ 5 mM del electrodo desnudo, del electrodo modificado con 11-MUA a concentraciones 1, 5 y 10 mM, del electrodo modificado con aPEG a concentraciones 1, 5 y 10 mM y del electrodo modificado con cPEG a concentraciones 1, 5 y 10 mM.

⁴ Información extraída de Sigma-Aldrich®. Link: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/jka5101?lang=es®ion=ES>

Por una parte, en los PEGs se observa un cambio en el perfil redox del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, indicando que la superficie del oro se ha modificado exitosamente. En ambos casos, este fenómeno se acentúa a concentraciones de 1 y 5 mM. En cambio, en el caso del 11-MUA a 10 mM, no se aprecia cambio alguno en comparación con la CV del electrodo desnudo. No obstante, a una concentración 5 mM, el 11-MUA es capaz de modificar significativamente la superficie del oro, en comparación con el resto de SAMs si atendemos al perfil de la CV.

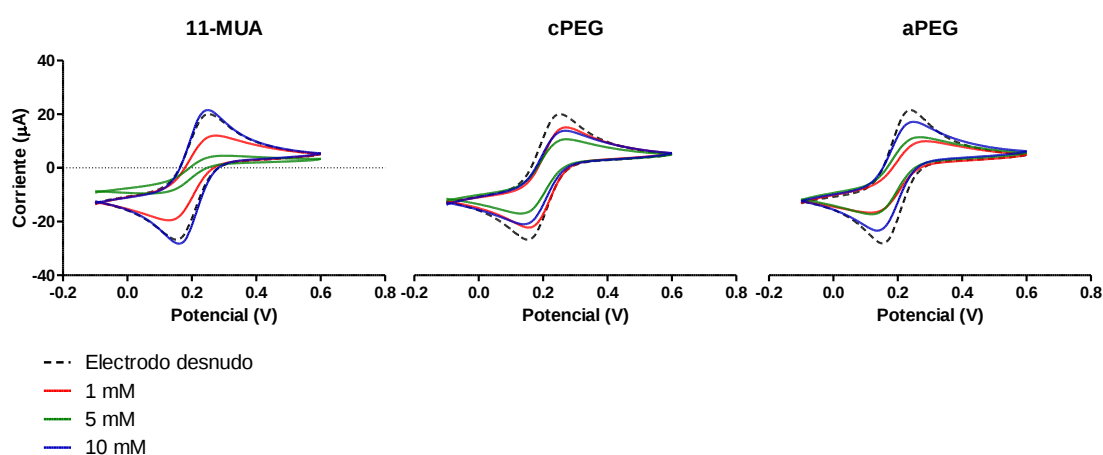


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos de la formación de la SAM del 11-MUA, cPEG y aPEG a diferentes concentraciones.

Del mismo modo, tras la activación de los grupos carboxilo y la inmovilización de los anticuerpos, se evaluó dicha inmovilización observando el perfil redox del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Cabría esperar un efecto mucho más marcado una vez la proteína es inmovilizada sobre la superficie, ya que al ser un cuerpo más voluminoso, a priori, impide la difusión del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ hacia la superficie del electrodo, cambiando significativamente su CV.

La figura 7 muestra los voltamperogramas cíclicos del ensayo redox del electrodo desnudo y modificado con las diferentes SAMs a las concentraciones determinadas, tras la activación de los electrodos y la inmovilización del anticuerpo de captura.

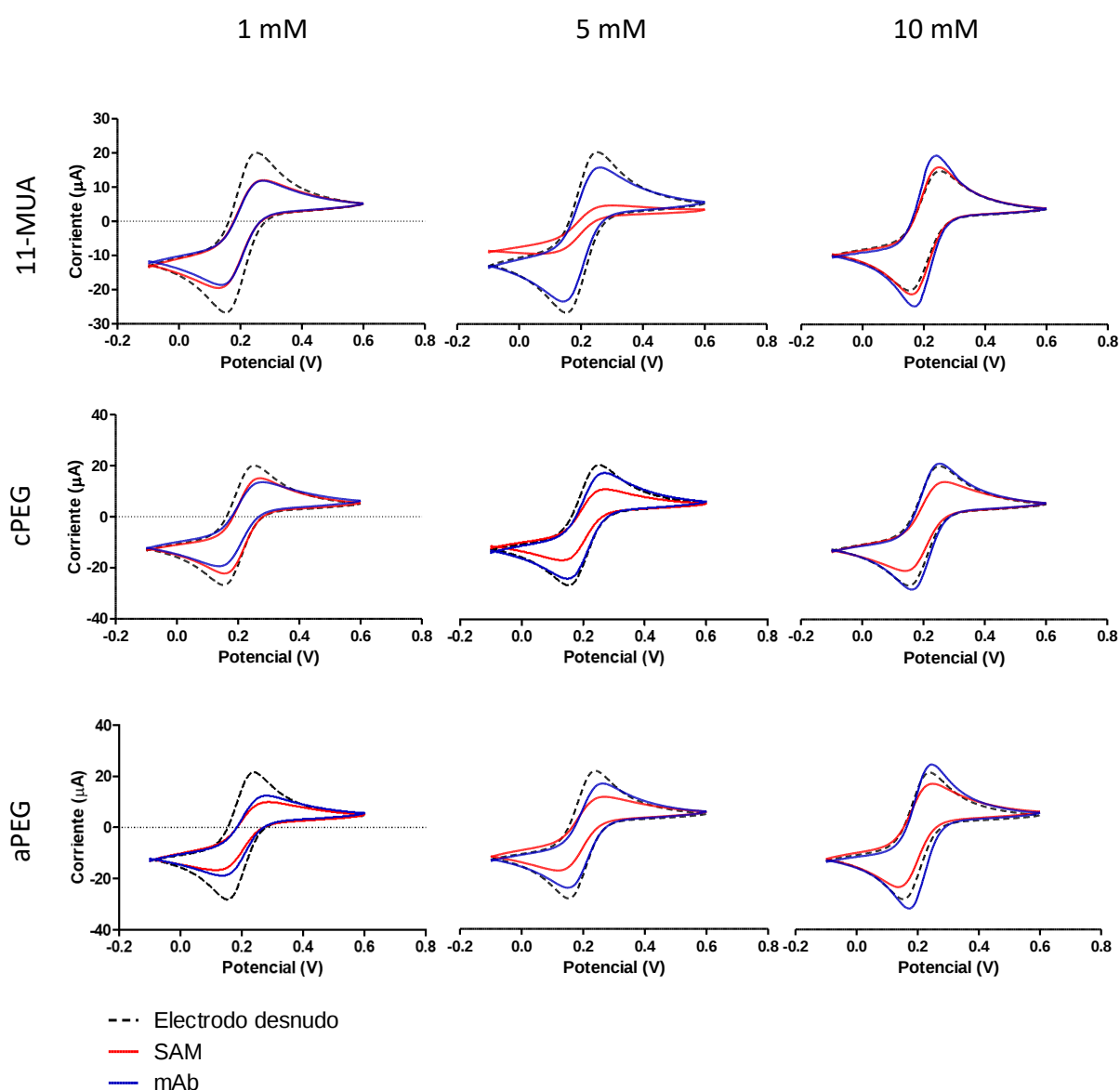


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos de la formación de la SAM e inmovilización del anticuerpo de captura del 11-MUA, cPEG y aPEG a diferentes concentraciones.

En referencia a la activación mediante EDC/sNHS, los perfiles de los voltamperogramas cíclicos no contienen diferencias significativas respecto a los de las SAMs. No obstante, los perfiles de los voltamperogramas de la inmovilización del anticuerpo de captura difieren a los anteriores. En el caso del 11-MUA, los picos se ensanchan significativamente y los picos de corriente máxima y mínima son mayores que los del electrodo desnudo, cosa que significa que hay pérdida de SAM o bien el anticuerpo no se ha capturado correctamente. Por otra parte, los perfiles de los PEG son mejores que los del 11-MUA. Aunque los picos de la concentración de 10 mM son mayores que los

del electrodo desnudo, los picos de las concentraciones menores, es decir 1 y 5 mM, son más estrechos. Esto significa que en la superficie del oro hay formación de SAM y/o captura del anticuerpo.

A la vista de los resultados, se determinó que el mejor perfil para la formación de la SAM sobre la superficie del oro eran el aPEG y cPEG a concentraciones de 1 o 5 mM.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con ambas SAMs, se decidió evaluar si había o no anticuerpo inmovilizado mediante la adición de un anticuerpo secundario capaz de reconocer específicamente el anticuerpo inmovilizado en la superficie del electrodo, tal y como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Adicionalmente, se hizo un estudio comparativo mediante ciclovoltametrías con el par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ tras cada etapa, tanto de la formación de la SAM, como del propio inmunoensayo (ver figura 8). Observando los perfiles obtenidos en cada caso, se puede concluir que es el sistema con cPEG 5 mM el que muestra un perfil de CV con diferencias significativas respecto al electrodo desnudo. No obstante, los picos de corriente máxima y mínima se van ensanchando tras cada etapa del ensayo.

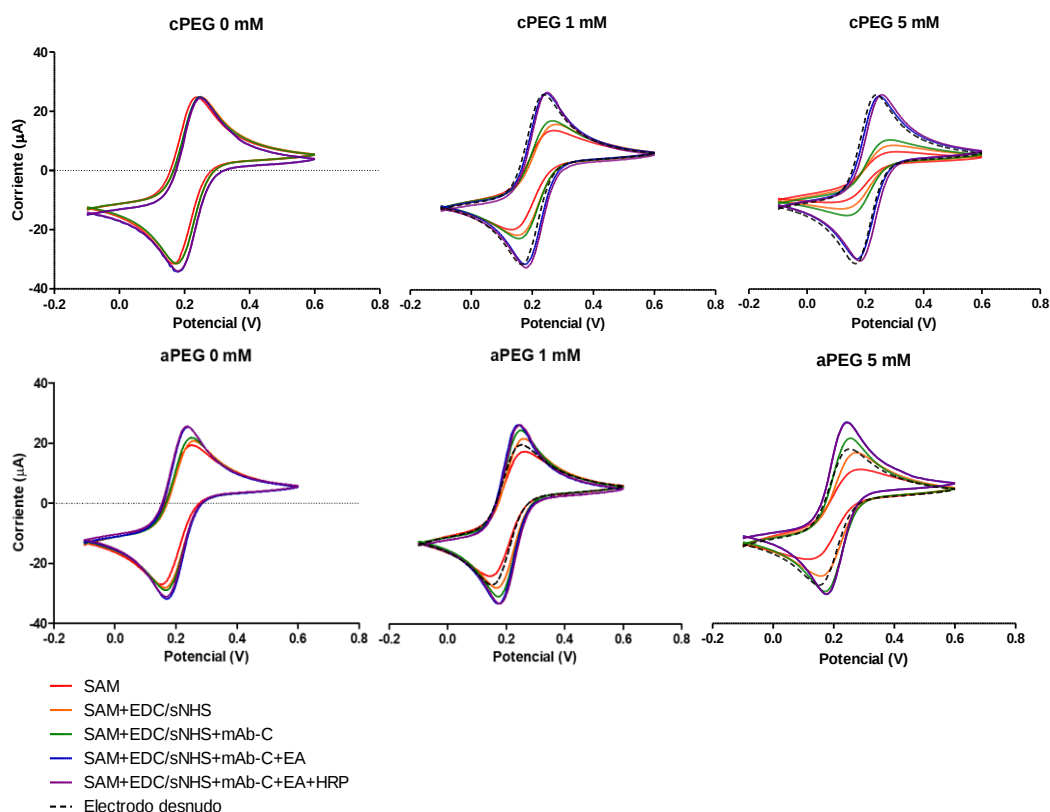


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos tras cada etapa de formación de la SAM, así como tras cada etapa del inmunoensayo con cPEG y aPEG a 0, 1 y 5 mM.

Del mismo modo, en la figura 9 pueden observarse los resultados del inmunoensayo con los diferentes controles y tras la sustracción del blanco. A priori, es con el cPEG con el que se consigue señal significativamente diferente de los blancos, siendo la concentración de 1 mM la que produce una señal más significativa.

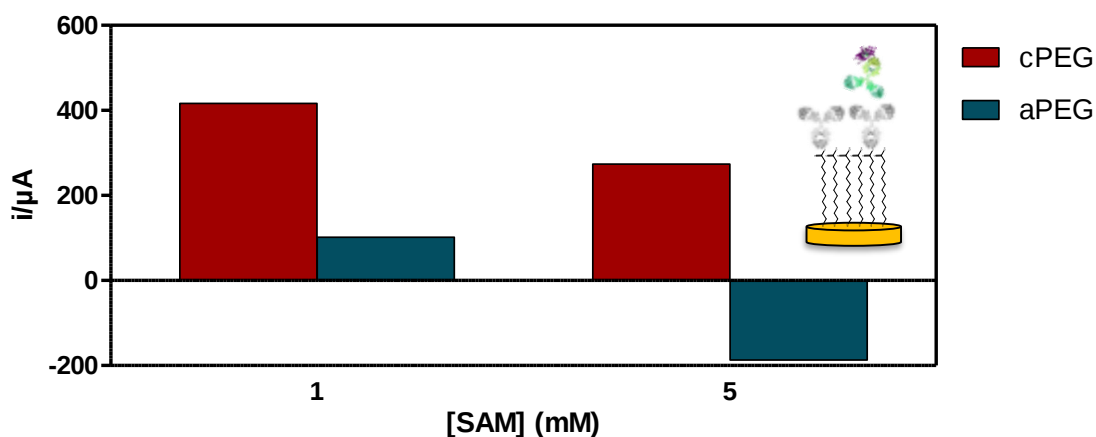


Figura 9. Señal amperométrica correspondiente a cada SAM a diferentes concentraciones y tras la inmovilización del anticuerpo y posterior adición de un anticuerpo secundario marcado con HRP.

No obstante, la falta de coherencia con los resultados de las CV, nos llevó a plantearnos las siguientes hipótesis:

- La SAM se va desorbiendo tras cada etapa debido a los diferentes lavados o bien la formación de la SAM no se lleva a cabo de forma idónea, necesitando más tiempo para favorecer la interacción entre el oro y el grupo tiol (R-SH). Esto puede ser debido a que la superficie de los electrodos de oro es muy rugosa, cosa que significa que los grupos tiol de la SAM, que interaccionan con la red metálica de oro, son incapaces de unirse a este, o lo hacen de forma muy irregular y no compactada. En consecuencia, la monocapa no se forma o solamente se une a los sitios más accesibles.
- La activación de los grupos carboxílicos mediante EDC/sNHS. La activación para la posterior inmovilización de los anticuerpos no se hace de forma satisfactoria, necesitando ser optimizada, por este motivo no se observa un cambio sustancial entre las CV una vez formada la SAM y tras la inmovilización del anticuerpo, pudiendo indicar que no hay anticuerpo inmovilizado.

- Los tiempos de incubación de los diferentes reactivos no son óptimos para la formación de la SAM, la activación y/o la inmovilización del anticuerpo, favoreciendo la desorción de la SAM a tiempos elevados de incubación.

Inicialmente se decidió confirmar la hipótesis de la activación, ya que a la vista de los diferentes perfiles de CV tras la formación de las diferentes SAM, nos indicaban que efectivamente, la SAM se formaba correctamente.

De este modo, se planteó el uso del DTSSP para la formación de la SAM y posterior inmovilización del anticuerpo, ya que en este caso, no era necesario realizar un paso de activación. Para ello, se llevó a cabo un inmunoensayo con el objetivo de comparar un reactivo ya activado (DTSSP 5mM) y otro reactivo que requería de la etapa de activación (cPEG 5 mM). Los resultados indicaron que el DTSSP no se había unido a la superficie del oro (figura 10), ya que las corrientes máximas y mínimas eran iguales que las del electrodo desnudo. Por otra parte, el cPEG sí se había unido a la superficie.

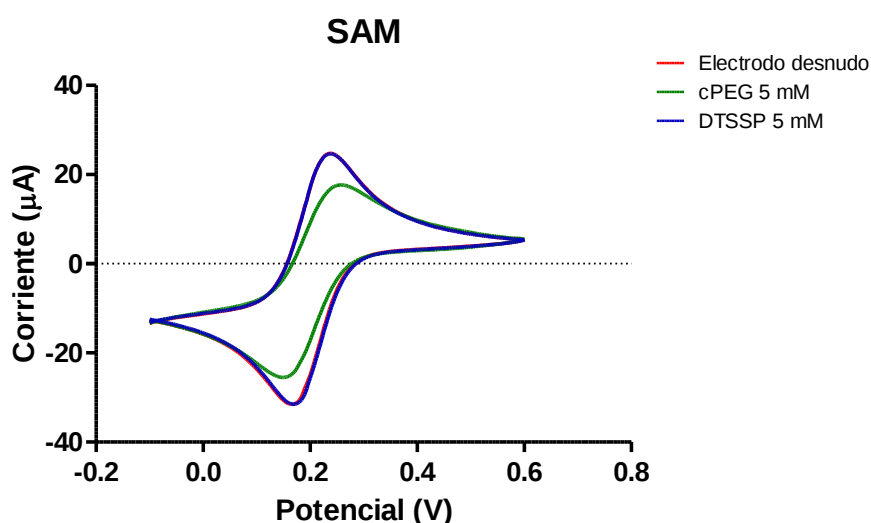


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos de la formación de la SAM mediante cPEG 5 mM y DTSSP 5 mM.

Una posible hipótesis por la que el DTSSP no se había ensamblado al oro es que el tiempo de incubación no era el óptimo. Por esta razón, se realizó un estudio para optimizar el tiempo de adsorción del DTSSP a la superficie (figura 11). Los resultados muestran que a 30 minutos y 2 horas ocurre la adsorción de dicho reactivo. No obstante, los picos de corriente máxima y mínima de la incubación de la SAM toda la noche se ensanchan respecto a los del electrodo desnudo, cosa que significa que la SAM se desorbe.

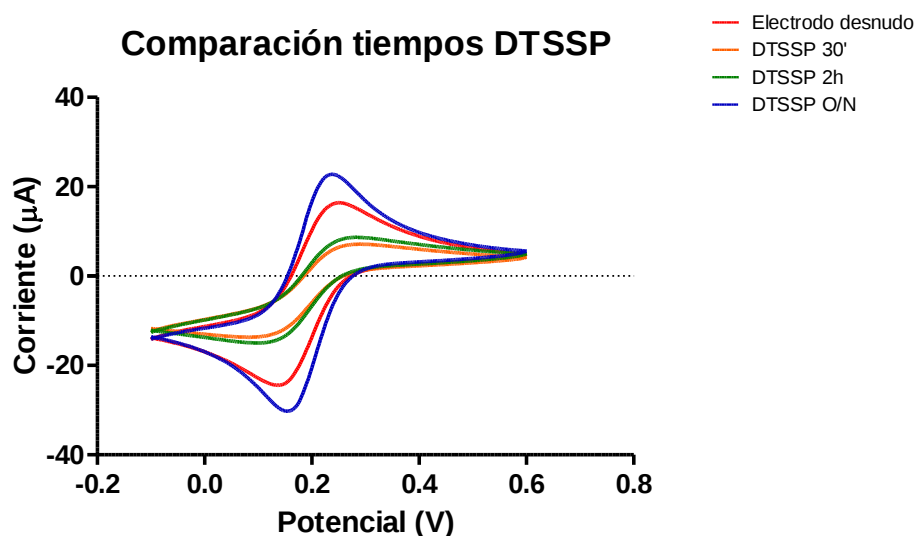


Figura 11. Voltamogramas cíclicos de la formación de la SAM con DTSSP 8 mM a diferentes tiempos.

Se puede concluir que tras 30 minutos, el DTSSP modifica significativamente la superficie del oro. Con esto se reduce el tiempo de incubación para la formación de la SAM de manera significativa y se evita la etapa de activación mediante EDC/sNHS.

Una vez determinada la caracterización de la SAM, se estudió si se producía la unión del anticuerpo de captura a esta y el tiempo necesario de incubación.

Para ello, se realizó un diseño experimental basado en voltametrías cíclicas con ferricianuro con el objetivo de comparar la inmovilización del anticuerpo de captura. Se evaluaron diferentes tiempos de incubación: 1 hora, 2 horas y toda la noche. La figura 12 muestra que la inmovilización del anticuerpo primario a un tiempo de incubación de 2 horas es más que suficiente para producir un efecto significativo en el perfil de la CV respecto al control. Además, estos resultados se corroboraron mediante la realización del inmunoensayo con un anticuerpo secundario, del mismo modo al que se ha indicado anteriormente. Los resultados mostrados en la figura 13 muestran como tras 2 horas de incubación del anticuerpo primario, la señal obtenida tras la sustracción del blanco, es más alta que en el resto de tiempos, indicando que hay más anticuerpo inmovilizado.

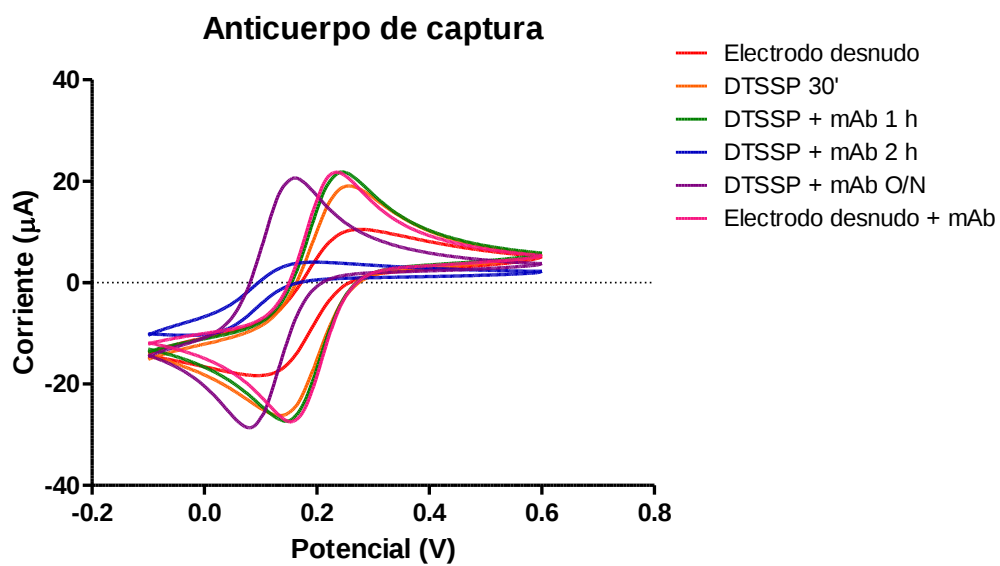


Figura 12. Voltamogramas cíclicos de la caracterización de la inmovilización del anticuerpo de captura empleando DTSSP 5 mM.

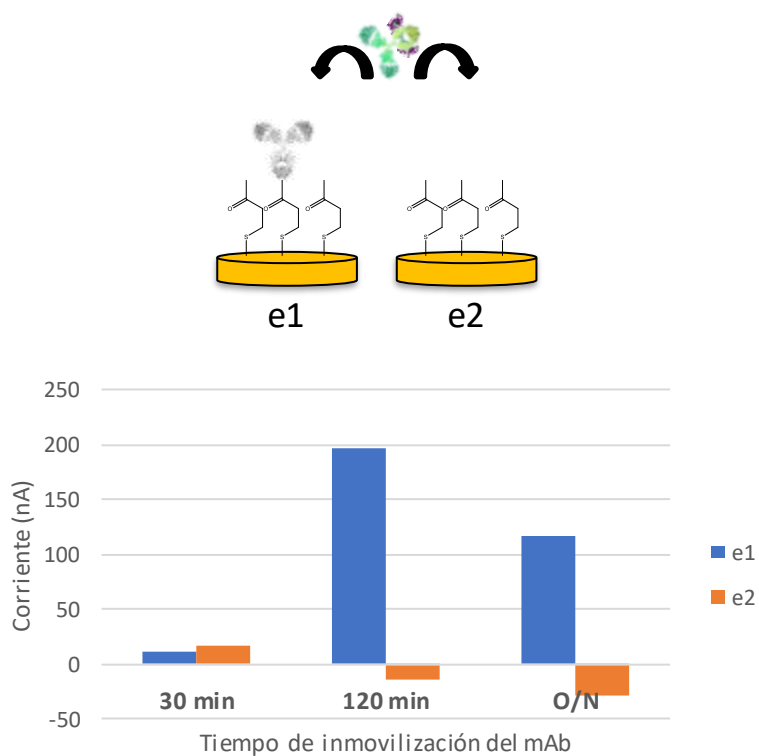


Figura 13. Formato del ensayo para la detección de anticuerpo inmovilizado sobre la superficie del oro. Tras incubar el anticuerpo primario a diferentes tiempos sobre la superficie del oro modificada con DTSSP, se añadió un anticuerpo secundario marcado con HRP para detectar específicamente el anticuerpo inmovilizado.

A la vista de los resultados preliminares obtenidos, y a falta de corroborarlos, se puede afirmar que el paso de activación de los grupos carboxilo en el resto de SAMs debe de ser optimizado.

6.3. Evaluación del efecto de diferentes agentes de bloqueo sobre las adsorciones inespecíficas

Tras determinar que con el DTSSP se conseguía inmoviliza anticuerpo, se procedió a la evaluación de las adsorciones inespecíficas en el inmunoensayo de detección de los biomarcadores celulares, y el estudio de diferentes agentes de bloqueo para eliminar dichas adsorciones. El bloqueo de adsorciones inespecíficas sobre la superficie del oro es un procedimiento usual en electrodos serigrafiados. Se han estudiado la etanolamina, la BSA y la leche como agentes de bloqueo a diferentes concentraciones.

La albúmina de suero bovino o BSA es una proteína extraída del suero bovino. Debido a que es una proteína pequeña, estable y no reactiva, es empleada usualmente como agente de bloqueo en inmunohistoquímica. La BSA se une a los sitios de unión inespecíficos, de tal manera que la probabilidad de la unión específica anticuerpo-antígeno será más elevada.

La etanolamina es un aminoalcohol viscoso e higroscópico con un olor similar al amoníaco.⁵

La leche contiene caseína, que es una fosfoproteína de tamaño menor a la BSA, por lo tanto siendo capaz de acceder a otros lugares y que se une a los sitios inespecíficos de la superficie del oro.

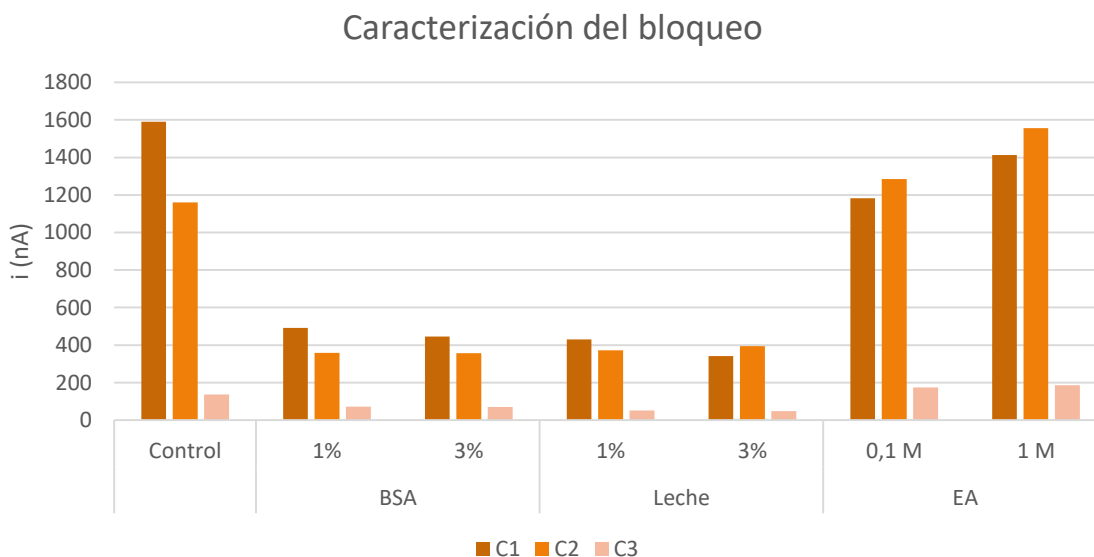
Tras la formación de la SAM e inmovilización del anticuerpo, se realizó un experimento donde se testó la BSA a concentraciones 1% y 3%, la leche a 1% y 3% y la etanolamina a 0,1 M y 1 M. La figura 14 muestra la intensidad de la señal (nA) derivada de la detección amperométrica. El objetivo de este estudio era determinar el mejor agente de bloqueo, además de comprobar qué reactivo se unía inespecíficamente a la superficie del oro, y en consecuencia, producía ruido de fondo. Para ello, al igual que se ha descrito anteriormente, se construyó un diseño experimental, el cual constaba de tres controles,

⁵ Información extraída de PubChem. Link: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanolamine#section=Top>

que permitía observar la señal específica del analito (C1), así como el ruido de fondo producido por el anticuerpo biotinilado (C2) o bien por la estreptavidina (C3). También se realizó un control, el cual no se le aplicaba ninguna solución de bloqueo, sino que contenía el medio de solución usado, que, en este caso, se trataba de PB. Como se observa en la figura, ninguno de los bloqueos estudiados fue capaz de eliminar por completo la adsorción inespecífica debida principalmente al anticuerpo biotinilado. Tanto la BSA como la caseína, disminuían significativamente la intensidad de la señal electroquímica, debido a que en parte, eran capaces de bloquear dichas interacciones no deseadas, pero no eliminarlas por completo.

Los perfiles de la detección amperométrica no varían significativamente entre las diferentes concentraciones. Por ello, se decidió que una menor concentración de agente de bloqueo es suficiente. De esta manera, se ahorra cantidad de reactivo consumido.

Se decidió trabajar con BSA 1% como mejor agente de bloqueo, a pesar de que no se habían eliminado por completo dichas adsorciones inespecíficas. Con este fin, se decidió evaluar, tras la etapa de bloqueo, el efecto del PBST frente al PB, tampón utilizado hasta ahora en las diferentes etapas del inmunoensayo.

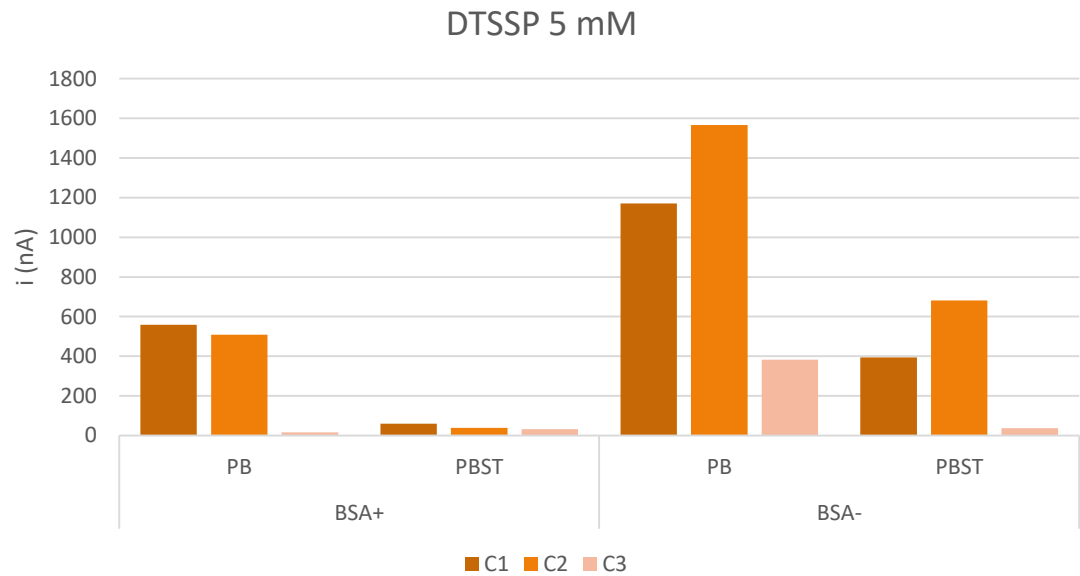


	C1	C2	C3
Analito	+	-	-
Anticuerpo biotinilado	+	+	-
Estreptavidina peroxidasa	+	+	+

Figura 14. Detección amperométrica para la caracterización del bloqueo. Los agentes de bloqueo son BSA, leche y EA a diferentes concentraciones.

La fuerza iónica puede modificar las interacciones de tipo hidrofóbico, y el Tween puede también ejercer como bloqueante en determinados casos (Riquelme *et al.*, 2016).

La figura 15 muestra que PBST en presencia de bloqueo disminuye la señal inespecífica debida al anticuerpo biotinilado significativamente, respecto al PB. No obstante, también disminuye la señal específica. Además, este estudio confirma que la unión inespecífica proviene del anticuerpo biotinilado, ya que se observa una diferencia significativa entre la señal del perfil C3 y la señal del perfil C2.



	C1	C2	C3
Analito	+	-	-
Anticuerpo biotinilado	+	+	-
Estreptavidina peroxidasa	+	+	+

Figura 15. Detección amperométrica del inmunoensayo con DTSSP 5 mM utilizando diferentes tampones de ensayo y comparando el uso de BSA como agente de bloqueo

7. Conclusiones

En base a los objetivos del trabajo, las conclusiones extraídas son:

- El UV/O₃ *cleaner* es el método más efectivo para el pre-tratamiento y activación de los electrodos de oro.
- El cPEG 5 mM y el DTSSP 5 mM son los mejores compuestos para la formación de la SAM. A pesar de ello, faltan repetir los experimentos para valorar la reproducibilidad de los mismos.
- El BSA 1% es el agente de bloqueo más efectivo para impedir las uniones inespecíficas sobre la superficie del oro. No obstante, diferentes experimentos deben de ser llevados a cabo con el fin de eliminar completamente dichas adsorciones e incrementar la señal específica
- Deben de realizarse estudios en profundidad de los diferentes tiempos de incubación durante las diferentes etapas de preparación de los electrodos.
- El anticuerpo biotinilado es el reactivo que se une inespecíficamente a la superficie del oro.
- Los electrodos serigrafiados de oro son una plataforma complicada para desarrollar biosensores.

8. Future work

Como se ha dicho anteriormente, se deberían confirmar los resultados obtenidos en referencia a la formación de la SAM mediante DTSSP 5 mM, con la finalidad de evaluar la reproducibilidad de estos. Por otra parte, también se deberían llevar a cabo más estudios con el fin de eliminar por completo las adsorciones inespecíficas, además de determinar los diferentes tiempos óptimos de incubación de los reactivos. De este modo, se optimizaría el inmunoensayo por completo.

Una vez optimizados los diferentes parámetros del método de detección de citoquinas mediante electrodos serigrafiados de oro, la finalidad es incorporar los biosensores en microfluídica. El objetivo de este método es la integración de un sistema que procesa cantidades pequeñas de fluidos a través de canales. La microfluídica tiene ventajas

respecto al método empleado en este proyecto, como la reducción de la manipulación continua del dispositivo, disminuyendo el error experimental de forma significativa. Por otra parte, se consume menos volumen de reactivos y es más rápido.

El objetivo del proyecto del grupo de investigación es testar diferentes fármacos contra la distrofia muscular miotónica. Para ello, se realiza la reprogramación de fibroblastos extraídos de pacientes y se fabrica tejido muscular esquelético mediante bioimpresión 3D. A través de estímulos eléctricos, se permite la expresión de los metabolitos secretados por el tejido. Una vez se obtiene el constructo 3D, se integra en un biorreactor, donde, mediante canales de microfluídica, se suministrará el medio que necesita para sobrevivir, además de los fármacos que se desean testar. Por otro lado, también se realiza la integración de los biosensores, que miden en tiempo real las citoquinas determinadas para el estudio de la enfermedad.

Los constructos 3D diseñados se combinan con los biosensores desarrollados con la finalidad de detectar respuestas celulares a estímulos externos, permitiendo realizar un seguimiento de forma continua del estado del tejido. Dicha investigación daría pie a ampliar el conocimiento sobre la función de los diferentes tejidos y la comunicación entre ellos en ciertas enfermedades. La integración de tejido funcionalizados con la tecnología de biosensores permite obtener los dispositivos conocidos como *organ-on-a-chip*. Este órgano en un chip es un sistema que tiene la finalidad de simular la actividad, la mecánica y la fisiología de los órganos y tejidos.⁶

De esta manera, es posible testar la eficacia de los diferentes fármacos para combatir la distrofia muscular de manera personalizada e individualizada sin el uso de animales, sino mediante el cultivo de células musculares del propio paciente.

9. Bibliografía

Asociación de la Distrofia Muscular. Hechos sobre la distrofia muscular miotónica (2010).

Aydin, S. (2015) 'Peptides A short history , principles , and types of ELISA , and our laboratory experience with peptide / protein analyses using ELISA', *Peptides*. Elsevier

⁶ Información extraída de IBEC. Link: <http://www.ibecbarcelona.eu/biosensors>

- Inc., 72, pp. 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Bhatia, S. N. and Ingber, D. E. (2014) 'perspective', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 32(8), pp. 760–772. doi: 10.1038/nbt.2989.
- Darwish, I. A. (2006) 'Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis : Basic Methodology and Recent Advances', (2), pp. 217–235.
- Dasgupta, A. (2016) *Immunoassays and Issues With Interference in Therapeutic Drug Monitoring, Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-802025-8.00002-7.
- Escamilla-gómez, V. *et al.* (2009) 'Biosensors and Bioelectronics Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive Escherichia coli quantisation', 24, pp. 3365–3371. doi: 10.1016/j.bios.2009.04.047.
- Kotanen, C. N. *et al.* (2012) 'Biosensors and Bioelectronics Implantable enzyme amperometric biosensors', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier B.V., 35(1), pp. 14–26. doi: 10.1016/j.bios.2012.03.016.
- Liu, F., Zhang, J. Z. H. and Mei, Y. (2016) 'The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system : A computational investigation through molecular dynamics simulations', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (June). doi: 10.1038/srep27190.
- Mammarella, A. *et al.* (2002) 'Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1', 201, pp. 59–64.
- Muscular Dystrophy Canada (2013). 'Myotonic Dystrophy Type I (Steinert's Disease)', pp. 4–6
- Riquelme, M. V *et al.* (2016) 'Sensing and Bio-Sensing Research Optimizing blocking of nonspecific bacterial attachment to impedimetric biosensors', *SBSR*. The Authors, 8, pp. 47–54. doi: 10.1016/j.sbsr.2016.04.003.
- Rountree, K. J. *et al.* (2017) 'A Practical Beginner ' s Guide to Cyclic Voltammetry'. doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- Safazadeh, L. and Berron, B. J. (2015) 'Photopatterning of Stable, Low-Density, Self-Assembled Monolayers on Gold'. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00001.

Schoser, B. and Timchenko, L. (2010) 'Myotonic Dystrophies 1 and 2 : Complex Diseases with Complex Mechanisms', pp. 77–90.

Sharma, R. *et al.* (2016) 'Biosensors and Bioelectronics Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg / ml sensitivity', *Biosensors and Bioelectronic*. Elsevier, 80, pp. 607–613. doi: 10.1016/j.bios.2016.02.028.

Takahashi, M. P., Swanson, M. S. and Nishino, I. (2017) 'Aberrant myokine signaling in congenital myotonic dystrophy', 21(5), pp. 1240–1252. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.018.Aberrant.

Taleat, Z. and Khoshroo, A. (2014) 'Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008 – 2013)', pp. 865–891. doi: 10.1007/s00604-014-1181-1.

10. Webgrafía

Sigma-Aldrich.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/jka5101?lang=es®ion=ES>
[Consulta: 31 mayo 2018]

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC).
<http://www.ibecbarcelona.eu/biosensors> [Consulta: 27 mayo 2018]

PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanolamine#section=Top>
[Consulta: 2 junio 2018]

BioForce Nanosciences. <http://bioforcenano.com/product/uv-ozone-cleaner-procleaner-plus/> [Consulta: 14 junio 2018]

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). http://ibecbarcelona.eu/wp-content/uploads/2015/01/ibec_corefacilities_plasma.pdf [Consulta: 14 junio 2018]

11. Autoevaluación

Mi estancia en prácticas en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña ha sido una experiencia positiva, tanto a nivel profesional como a nivel personal.

Por una parte, he desarrollado la capacidad de trabajar profesionalmente en un laboratorio. He adquirido experiencia en el campo de la detección de citoquinas mediante los electrodos serigrafados de oro. Además, he interpretado los diferentes resultados que he obtenido. Dado que nos hemos encontrado con diferentes problemas en la optimización de los diferentes parámetros del método, he podido desarrollar la capacidad crítica para tratar los resultados y buscar maneras de reconducir la experimentación.

Por otra parte, he adquirido mucho conocimiento sobre la metodología determinada para la detección de citoquinas. El hecho de encontrarnos con algunos obstáculos, como en la etapa de formación y caracterización de la SAM, me ha obligado a buscar soluciones efectivas para poder conducir es estudio.

Además, me he dado cuenta que la investigación conlleva mucho trabajo y que un artículo científico conllevan años de trabajo. La estancia me ha permitido tener una visión más amplia sobre el mundo laboral y profesional.

En conclusión, mi estancia en prácticas y la realización del trabajo de fin de grado ha sido una experiencia enriquecedora, ya que he podido aumentar mi formación como biotecnólogo profesional, he adquirido experiencia en el sector y he desarrollado habilidades como la organización, el trabajo en equipo, la responsabilidad y la capacidad crítica.

12. Anexos

12.1. **Anexo I.** Información detallada de los electrodos serigrafiados de oro

Anexo I. Información detallada de los electrodos serigrafiados de oro

8X Screen-Printed Gold Electrode

Ref. 8X220AT



DropSens launches a new screen-printed electrochemical array formed by eight 3-electrode electrochemical cells with gold-based working electrodes. The system is also available with carbon working electrodes (ref. 8X110), platinum working electrodes (ref. 8X550) and can be customised with other working electrode materials such as silver or carbon modified with nanomaterials.

These disposable **8X220AT Electrodes** (ref. 8X220AT) have the typical electrochemical cell configuration and are suitable for working with microvolumes, for decentralized assays or to develop specific sensors. Specially designed for the development of **multiple simultaneous analysis**.

Useful to be used with standard **multichannel micropipettes**.

Ceramic substrate: L33 x W78 x H1 mm

Electric contacts: Silver

The electrochemical cell consists of:

Working electrode: Gold (2.56 mm diameter)

Auxiliary electrode: Gold

Reference electrode: Silver

These 8X220AT Screen-Printed Electrodes are commercialised in 20 units pack. They should be stored at room temperature, protected from light in a dry place.

Also, specific **connectors** and accessories for this electrochemical array are available at **DropSens**, as well as our compatible **µStat 8000/P Multi Potentiostat/Galvanostat**.

Related products



CAST8X



STAT8000/P



FLWCL8X



MAGNET8X



8X110

Full Catalogue



Parque Tecnológico de Asturias - Edif. CEEI. 33428 LLanera (Asturias). Spain
(+34) 985 27 76 85 - info@dropsens.com - www.dropsens.com

Contact Form

