

A close-up photograph of a multi-well microplate with several pipettes positioned over it, ready for use. The image is in grayscale, with a dark purple overlay at the top containing text.

TRABAJO FINAL DE GRADO | BIOTECNOLOGÍA

The logo of the Universitat Rovira i Virgili, featuring a stylized red 'URV' monogram.

UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Desarrollo de inmunosensores electroquímicos basados en el uso de partículas magnéticas para la detección *in situ* de IL-6 y TNF α

SOFÍA RAIGON LÓPEZ

TUTOR ACADÉMICO: DR. LLUIS MASIP
TUTOR PRÁCTICAS: DR. JAVIER RAMÓN

TARRAGONA | JUNIO 2018

Índice

Datos del Centro	4
Resumen y palabras clave	6
Introducción	7
Hipótesis y objetivos.....	12
Metodología	13
Resultados y discusión.....	20
Conclusiones.....	27
Bibliografía.....	29
Autoevaluación.....	31

Agradecimientos

Primero de todo, me gustaría agradecer al grupo de investigación *Biosensors for Bioengineering*, especialmente al Dr. Javier Ramón por darme la oportunidad de poder trabajar en su equipo. También mencionar a Alejandro Hernández y María Alejandra Ortega por ayudarme y aconsejarme durante las prácticas.

Al Dr. Lluís Masip por ser mi tutor y aconsejarme cuando lo necesitaba.

Y, por último, pero igual de importante, a mi familia por creer en mí y hacer posible estos meses en Barcelona, confío en que no era tarea fácil pero siempre estabais ahí cuando lo necesitaba.

Gracias a todos por haber hecho de estos meses, una experiencia difícil de olvidar.

Datos del Centro

Institute for Bioengineering of Catalonia

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC) se ubica en el Parque Científico de Barcelona, el cual fundado en 1997 y que cuenta con más de 2.700 investigadores, y con 100 empresas. Es un centro dedicado a la investigación interdisciplinar internacional de primer orden, con la que, mediante la creación de conocimiento, contribuye a mejorar la salud y la calidad de vida y a generar riqueza.

IBEC fue fundado en 2005 por las Consejerías de Innovación, Universidades y Empresa y de Salud de la Generalitat de Catalunya, por la Universidad de Barcelona (UB) y por la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC). Esta institución cuenta con más de 740 publicaciones científicas, la mayoría en revistas de alto impacto, con 23 patentes y 3 empresas *spin-off*. En 2015 se le otorgó el premio Excelencia Severo Ochoa y el sello de 'Excelencia en Recursos Humanos en Investigación' por la Comisión Europea.

Sus principales objetivos son: la investigación básica e interdisciplinar en bioingeniería y nanomedicina, colaborar con instituciones académicas, hospitales y el sector industrial mundial, transferir conocimiento y tecnología al sector biomédico, mejorar la salud y la calidad de vida, y, por último, formar la próxima generación de expertos en tecnología sanitaria.

Biosensors for Bioengineering

El grupo de *Biosensors for Bioengineering*, dirigido por el Dr. Javier Ramón Azcón, enfoca su trabajo en combinar la tecnología emergente de los biosensores y nanotecnología con las células madre e ingeniería de tejidos. Su objetivo es la obtención de microdispositivos para detectar respuestas celulares a estímulos externos, monitorizando la calidad del microambiente y manteniendo los diversos requisitos celulares. La integración de tejidos funcionales con la tecnología a microescala de biosensores les permite obtener *organs-on-a-chip*, los cuales pueden ser usados en ensayos farmacéuticos y en un futuro, a crear sistemas *in vitro* en la que se puedan estudiar los efectos de diversos medicamentos, crucial en la industria médica y farmacéutica. El proyecto actual del grupo de investigación, *Diabetes Approach by Multi-Organ-on-a-Chip* (DAMOC) se encuentra financiado por el Consejo Europeo de

Investigación (ERC). El objetivo de este proyecto es la fabricación de un dispositivo biomimético multi-órgano integrado en un chip compuesto por islotes pancreáticos y tejido musculoesquelético para estudiar las enfermedades metabólicas de la glucosa, enfocado en la diabetes del tipo 2 (T2D), y para las aplicaciones de detección y validación de fármacos.

Resumen y palabras clave

En los últimos años, los experimentos desarrollados empleando biosensores ha incrementado exponencialmente. Un estudio de *Scopus* en el período de publicación entre 1972-2017 utilizando la palabra "biosensor" revela una tendencia exponencial en el número de publicaciones en este campo. Esto es debido a las múltiples aplicaciones que ofrecen los biosensores, los cuales se emplean en biología, química analítica, física y bioelectrónica.

En este proyecto se apuesta por el desarrollo de inmunosensores de transducción electroquímica usando partículas magnéticas, empleando electrodos serigrafiados de carbón, para detectar IL-6 y TNF α . La integración de partículas magnéticas en ensayos bioanalíticos permite la captura eficiente y la separación del analito. Además, se puede lograr una gran amplificación de la señal con el uso de enzimas.

El objetivo principal de este trabajo se centra en el desarrollo de un sistema de captura *in situ* de las citoquinas IL6 y TNF α , mediante el uso de partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos específicos, para así estudiar los diferentes efectos sobre el tejido, tanto de estímulos físicos como químicos. Para alcanzar dicho objetivo, se trabajó en la optimización de las concentraciones de cada inmunorreactivo y de las diferentes condiciones de ensayo, para la construcción de las rectas de calibrado para cada uno de los biomarcadores.

Palabras clave: *inmunosensores, detección amperométrica, IL-6, TNF α , electrodos serigrafiados de carbón, partículas magnéticas, detección in situ.*

Introducción

En los últimos años, el desarrollo de plataformas capaces de integrar exitosamente biorreactores microfluídicos y/o plataformas tipo *organ-on-a-chip*, con dispositivos sensores capaces de registrar cambios en el tejido mimetizado, ha ido en aumento por diferentes motivos. Estos sistemas son capaces de modelizar funciones fisiológicas de tejidos y órganos en un ambiente controlado, pudiendo desarrollar tejidos afectados y realizar análisis preclínicos *in vitro* de diferentes fármacos, mediante el uso de biosensores. El término biosensor apareció por primera vez en los años 60 para definir el uso de bioelectrodos que presentaban enzimas y actividades biocatalíticas (Rodríguez, J., G. *et al.*, 2015). En la actualidad, los biosensores se definen como dispositivos analíticos que convierten una respuesta biológica en una señal cuantificable. Los biosensores se utilizan en varias áreas de la biotecnología, entre ellas se encuentra la medicina, agricultura y medioambiente. Éstos son capaces de proveer información analítica cuantitativa o semicuantitativa de forma rápida y fiable. Por excelencia, los biosensores deben de ser altamente específicos, independientemente de los parámetros físicos como el pH y la temperatura y deberían ser reutilizables (Mehrotra, P., 2016). En este sentido, los materiales nanoestructurados han contribuido al desarrollo de nuevas herramientas que permiten la automatización de procesos, facilitan la miniaturización y multiplexación de los análisis, ya que poseen unas propiedades físicas, mecánicas, eléctricas y térmicas bien definidas y ventajosas respecto al resto de materiales (Pacheco, J., G. *et. al*, 2016).

La fabricación de biosensores, sus materiales, los dispositivos de transducción y los métodos de inmovilización para la producción de estos dispositivos, requiere investigación multidisciplinar como química, física, biología e ingeniería. Los materiales usados en esta área están categorizados en tres grandes grupos basándose en los mecanismos usados:

- Materiales catalíticos, aquellos que hacen uso de enzimas como elementos fundamentales para su funcionamiento.
- Materiales que utilizan microorganismos para poder determinar parámetros de calidad de las aguas como la demanda bioquímica de oxígeno, entre otros.

- Materiales basados en reacciones de bioafinidad, donde se incluyen anticuerpos y ácidos nucleicos (Mehrotra, P., 2016).

Dentro de estos últimos, se encuentran aquellos conocidos como inmunosensores, que hacen uso de anticuerpos tomando ventaja de la afinidad que éstos presentan por su antígeno, para la detección desde moléculas de bajo peso molecular, como pesticidas o antibióticos, hasta proteínas como por ejemplo determinados biomarcadores asociados a diferentes enfermedades como el cáncer o enfermedades cardiovasculares, como es el caso de los proyectos NanoCardioCoco y SEA-on-a-CHIP. Debido a la alta estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo junto con el hecho de que es el anticuerpo el que comúnmente se inmoviliza en la superficie del transductor, la mayoría de los inmunosensores son de un solo uso. Gran parte de estos inmunosensores están basados en el uso de enzimas. Mediante la adición del correspondiente sustrato, la señal generada por este enzima puede cuantificarse a través de diferentes métodos de transducción como la colorimétrica, midiendo la absorbancia a una determinada longitud de onda, o bien mediante transducción eléctrica, midiendo el intercambio de electrones generado a través de una serie de electrodos.

Este trabajo se basa en el uso de partículas magnéticas (MBs) sobre las cuales se ha inmovilizado anticuerpo específico para, tras una etapa de captura y consiguiente realización del inmunoensayo, poder cuantificar la cantidad de citoquinas presente en la muestra mediante el uso de electrodos serigrafiados de carbón con un soporte con imanes, capturando así las MBs y realizando la medida electroquímica correspondiente.

Uno de los biomarcadores celulares seleccionados, concretamente la interleuquina 6 (IL-6), desarrolla un papel importante en la actividad del músculo. El músculo esquelético adulto es un tejido dinámico capaz de responder a estímulos ambientales, además de producir y secretar factores tróficos. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos e interleuquina 4 (IL-4), entre otros. En la última década, el músculo esquelético se ha identificado como un órgano secretor, por lo tanto, las citoquinas y otros péptidos producidos expresados y secretados por las fibras musculares, capaces de ejercer efectos autocrinos, paracrinos o endocrinos, se clasifican como mioquinas (Muñoz-Cánoves *et al.*, 2013).

La IL-6 es una mioquina de 22-27 kDa y fue clonada y caracterizada por primera vez a mitades de los años 80 por varios grupos de investigación independientes. Esta mioquina forma parte de una familia de proteínas que se caracterizan por formar un empaquetamiento de cuatro hélices α . La IL-6 posee funciones pleiotrópicas en diferentes tejidos y órganos, afectando al sistema cardiovascular, al metabolismo lipídico, interviniendo en la resistencia a la insulina, a la actividad mitocondrial, al sistema neuroendocrino y al comportamiento neuropsicológico (Hunter, C. A. *et al.*, 2015).

El músculo esquelético produce y sintetiza niveles considerables de IL-6 después de una actividad física prolongada, su liberación está inducida por la interleuquina 1 (IL-1) y se incrementa en respuesta al Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) (Tanaka, T. *et al.*, 2014). La vía de señalización de IL-6 se ha asociado con la estimulación del crecimiento del músculo hipertrófico y miogénesis a través de la proliferación de células madre del músculo. Además, la IL-6 también participa en la regulación del metabolismo energético, el cual está vinculado a la capacidad de contraer activamente el músculo para sintetizar y liberar IL-6 (Muñoz *et al.*, 2013). Adicionalmente, la IL-6 es una citoquina clave en procesos infecciosos, cáncer e inflamación, el cual dirige la progresión o contribuye al mantenimiento de las respuestas inmunológicas (Sedger, L. M., *et al.*, 2014).

El segundo biomarcador celular seleccionado fue el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), inicialmente conocido por su citotoxicidad tumoral, fue descubierto en 1975 como una endotoxina inducible que causa necrosis en tumores *in vitro*. Actualmente, se conoce por ser un potente intermediario de la inflamación, como otras funciones fisiológicas normales en homeostasis e inmunidad microbiana (Sedger, L. M., *et al.*, 2014). La TNF α es una proteína transmembranal de 26 kDa expresada por monocitos/macrófagos activados (incluyendo microgliales del sistema nervioso central (CNS)), células NK y T activadas y también por un amplio rango de células no-inmunes como células endoteliales y fibroblastos. Concretamente, la TNF α tiene un rol muy importante en el funcionamiento normal del músculo. Éste se encarga inicialmente de aumentar la proliferación de nuevas células musculares y facilitar la apoptosis de células musculares antiguas, por lo tanto, se encarga de mantener el ciclo de regeneración activo. Sin embargo, cuando hay una variación en los niveles normales de TNF α se

produce un incorrecto funcionamiento del músculo. Con una subida de estos niveles en pocas horas, la TNF α inhibe la función contráctil del propio músculo. Esto se produce por la reducción de la fuerza contráctil y alterando la respuesta muscular por activación de calcio. Un incremento prolongado de TNF α causa la inhibición de la síntesis de músculo esquelético y miopatía del musculo esquelético (Maillard, S. *et. al*, 2016).

El trabajo descrito en esta memoria se engloba dentro del proyecto DAMOC, donde uno de los objetivos principales es la fabricación de un dispositivo multi *organ-on-a-chip* biomimético capaz de integrar tejido muscular esquelético e islotes pancreáticos para el estudio del metabolismo de glucosa en determinadas enfermedades, como la diabetes y para estudiar el efecto de diferentes fármacos sobre estos tejidos y/o enfermedades modelizadas. Este tipo de dispositivos ofrecen una predicción más exacta de las respuestas humanas e incluso una predicción de las interacciones entre órganos en sistemas multiórgano, además de reducir el uso de animales de laboratorio para el estudio y modelización de enfermedades (Junaid, A. *et al.*, 2017). En este sentido, el uso de biosensores acoplados a estos sistemas multiórgano, permite realizar un seguimiento de la respuesta de estos constructos frente a diferentes estímulos, tanto físicos como químicos, mediante la detección de determinados biomarcadores celulares, como son las citoquinas anteriormente descritas.

El hecho de poder realizar un seguimiento continuo e *in situ* de las diferentes respuestas de sistemas tipo *organ-on-a-chip* frente a diferentes estímulos, es esencial para entender tanto el comportamiento de la enfermedad como los efectos de determinados fármacos, y, por tanto, predecir las reacciones de los órganos humanos y poder contribuir al desarrollo de una medicina más dirigida (Zhang *et al.*, 2017).

En el contexto de este trabajo, se decidió hacer uso de partículas magnéticas, sobre las cuales se inmovilizaban anticuerpos específicos, para la captura selectiva de ambos marcadores descritos anteriormente.

En trabajos anteriormente publicados, como el caso de Riahi *et al.* (2015), se utilizaron MBs en un sistema estático, es decir, unidas a la superficie del sensor por efecto de un campo magnético. Posteriormente, esta plataforma era integrada en microfluídica, conectando así el biorreactor con el sensor, con el fin de poder realizar seguimientos en

tiempo real, de los diferentes fenómenos ocurridos en el constructo 3D. Por una parte, esto disminuye tanto el error humano en cada experimento debido a la baja manipulación de las muestras, así como la cantidad de muestras e inmunorreactivos utilizados en el ensayo. No obstante, no aprovecha la relación superficie/volumen de las partículas, perdiendo sensibilidad.

Es posible encontrar otros trabajos en la literatura donde utilizan las partículas de forma dinámica, aprovechando su relación superficie/volumen, como es el caso de Sista *et al.* (2008). En este sentido, se decidió desarrollar una aproximación similar, pero obviando la microfluídica, ya que en muchos casos presenta problemas de obturación de canales por parte de las partículas magnéticas. El ensayo consistía en añadir los reactivos en la suspensión de MBs, su posterior incubación, fijar las MBs en imanes en los lavados y finalmente, realizar la medida electroquímica mediante la adición del sustrato. Al tratarse de MBs, son fácilmente manipulables en presencia de un campo magnético externo y sin presencia de éste, su resuspensión es sencilla.

Considerando todo lo mencionado anteriormente, en este trabajo se ha decidido realizar una aproximación a media distancia entre las dos publicaciones anteriormente citadas. Para ello, se fabricaría el constructo 3D sobre una plataforma tipo *transwell*, cuya base está formada por una membrana porosa y permeable, y la captura *in situ* de los diferentes biomarcadores celulares excretados, mediante la adición de los bioconjugados MBs presentes en la parte inferior de dicho *transwell*. Seguidamente, las diferentes etapas del inmunoensayo se completaría de forma secuencial, tal y como muestra la Figura 1.

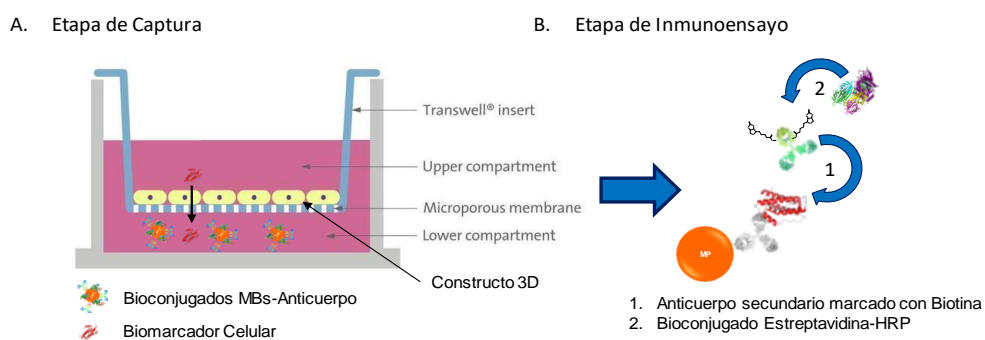


Fig. 1. a) Primera etapa, constructo en el transwell, b) Fase de detección añadiendo mAb-B y SAV-pHRP en placa de 96 pocillos.

Hipótesis y objetivos

Debido a que las MBs poseen una cinética de reacción rápida, comparada con las superficies sólidas, una elevada relación superficie/volumen (debido a su pequeño diámetro) y una alta estabilidad; prometen ser una buena opción en el desarrollo de biosensores. Las partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos podrían utilizarse para detectar las citoquinas IL-6, característica de procesos inflamatorios del tejido muscular, y TNF α , regulador de la interleuquina anteriormente mencionada.

El objetivo principal de esta investigación es el desarrollo de inmunosensores de transducción electroquímica capaces de realizar una captura *in situ* de los biomarcadores segregados por los constructos 3D bajo determinados estímulos, y basados en el uso de partículas magnéticas. Para esto se han seguido las siguientes subtarefas,

- Preparación de conjugados mediante la inmovilización del anticuerpo monoclonal anti IL-6 o TNF α en la superficie de las MB, de 1 μm de diámetro.
- Optimización de las diferentes concentraciones de inmunorreactivos mediante ensayos tipo 2D.
- Construcción de las rectas de calibrado para cada uno de los biomarcadores.

Metodología

Materiales e instrumentación

Las medidas amperométricas fueron realizadas en un multipotenciostato μ STAT 8000P portable (DropSens, España) utilizando electrodos serigrafiados de carbono 8x (DRP-8X110, DropSens, España) que consisten en ocho celdas 3-electrodos electroquímicos con base de carbón. La celda electroquímica utilizada para realizar las medidas electroquímicas fue fabricada a demanda por el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM). Esta celda consta de dos partes acoplables mediante tornillos. En una de ellas están integrados 8 imanes de neodimio para capturar las partículas magnéticas, y otra consta de 8 pocillos que facilitan la manipulación de las soluciones presentes en cada sensor. Para realizar el tratamiento de datos se utilizó el software *Graph Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se usaron multiplacas Nunc™ tratadas para cultivo celular de 6 pocillos (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA) y microplacas de 96 pocillos no tratadas (Daslab, Barcelona, España) para la realización de las diferentes etapas del inmunoensayo. Limpiador de placas de 96 pocillos 405 TS (BioTek, Winooski, VT, USA). Vórtex IKA MS3 Digital (IKA, Staufen, Alemania). Incubador Galaxy® 170S de CO₂ apilable con capacidad de 170 L (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Tampones y soluciones

Para la preparación de conjugados a partícula magnética se utilizó 0.1M tampón borato (H₃BO₃) a pH 9.5.

Para la primera etapa del inmunoensayo, etapa de captura, se utilizó medio de diferenciación DM, que consta de DMEM 1X (41965-039, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA) a 1% estreptomina/penicilina y 2% en suero equino.

Se utilizó 0.01M tampón fosfato salino con 0,05% Tween y 1% en albúmina de suero bovino (PBST-BSA 1%) a pH 7.5 para realizar la incubación con el anticuerpo secundario y estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (SAV-pHRP).

Para activar los electrodos de carbono se utilizó 0,1M de H₂SO₄. Para la realización de las medidas electroquímicas se utilizó el tampón citrato a 0.04 M y 0.1 M en KCl a pH

5.5. La disolución de sustrato es 16 μL de TMB al 6 mg/mL y 8 μL de H_2O_2 1% preparados en 978 μL de tampón citrato 0.04 M y 0.1 M KCl, pH 5.5.

Reactivos e inmunorreactivos

Las partículas magnéticas (Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated, Life Technologies, Waltham, MA, USA) son micropartículas superparamagnéticas recubiertas de poliestireno y a su vez de una capa poliuretano, de 1 μm de diámetro. En la superficie de estas partículas se encuentran grupos tosilo capaces de reaccionar espontáneamente con los grupos amino primario de los anticuerpos y facilitar así su inmovilización de forma covalente.

Los anticuerpos utilizados en el caso de IL-6, anticuerpo purificado anti-ratón IL-6 y anticuerpo biotinilado (mAb-B) anti-ratón IL-6 fueron adquiridos en BD Pharmingen™ (Franklin Lakes, New Jersey, USA) y en los experimentos con $\text{TNF}\alpha$ el anticuerpo purificado antiratón/rata $\text{TNF}\alpha$, y el anticuerpo marcado con biotina anti-ratón $\text{TNF}\alpha$ fueron adquiridos en BD Pharmingen™ (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Las citoquinas IL-6 recombinante de ratón (200-02AF-100ug, Shenandoah Biothecnology INC.™, Warwick, Pennsylvania, USA) y $\text{TNF}\alpha$ recombinante de ratón (200-31AF-100ug, Shenandoah Biothecnology INC.™, Warwick, Pennsylvania, USA).

Se empleó estreptavidina poly-HRP (21140, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA).

Procedimiento

Conjugación de las partículas magnéticas

Se tomaron 20 μL del stock de partículas magnéticas y se resuspendieron en 1mL de tampón borato. Se realizaron 3 lavados mediante el uso de rack magnético. Seguidamente, tras retirar el sobrenadante, se procedió a la etapa de conjugación (ver figura 2). Con este fin, las partículas se resuspendieron 160 μL de una solución de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo y se incubaron 48h en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó el conjugado (MBs-mAb) dos veces y se conservó el sobrenadante para la estimación del rendimiento de conjugación mediante ensayo de proteína Bradford. Con el fin de bloquear grupos tosilo que no reaccionaron con ningún anticuerpo, el bioconjugado se resuspendió en 250 μL de PBST BSA 1% y se dejó en

agitación 24h. Finalmente, se retiró de nuevo el sobrenadante y se resuspendió en 250 μ L de PBST BSA 0.5% para conservarlo a 4°C. La relación anticuerpo/MBs durante la conjugación fue de 40 μ g mAb/mg MB, recomendada por el fabricante.

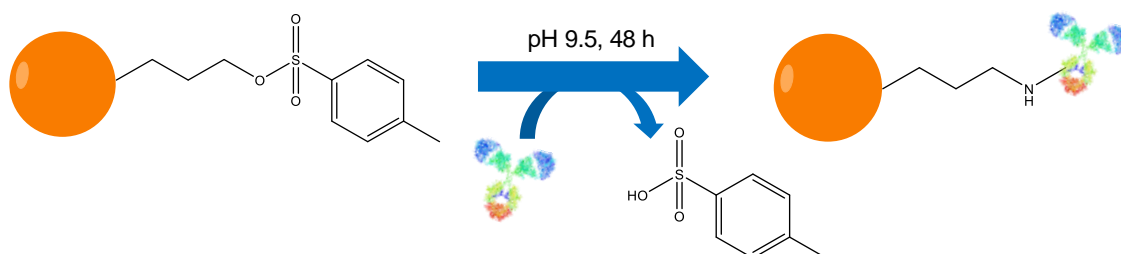


Fig. 2. Esquema de la reacción de conjugación de las partículas magnéticas con los anticuerpos específicos contra cada una de las citoquinas.

Para poder caracterizar las MBs conjugadas se realizó el test Bradford. Éste consistía en realizar una recta patrón de 8 puntos en una placa de 96 pocillos, con una concentración inicial de un anticuerpo monoclonal como estándar a 100 μ g/mL, realizando diluciones seriada $\frac{1}{2}$. En la misma placa se añadieron los sobrenadantes retirados anteriormente (tanto de la carga de anticuerpo como los correspondientes a los diferentes lavados), y se realizaron 4 diluciones diferentes para cada uno de ellos. Tras la realización de las diferentes diluciones, se añadió el reactivo Bradford a una dilución final de $\frac{1}{5}$, tal y como indica el fabricante. Transcurridos 5 minutos se procedió a la lectura de la placa a 595 nm.

Optimización de la concentración de los inmunorreactivos

El procedimiento seguido para la realización del inmunoensayo, esquematizado en la figura 3, consistía inicialmente en una etapa de captura donde los bioconjugados MBs-mAb se incubaban con el analito, IL-6 o TNF α , en placas de 6 pocillos durante 60 minutos a 37 °C y agitación suave, con el fin de emular las condiciones finales del ensayo con tejido y *transwell*. Transcurrido ese tiempo, las partículas magnéticas eran capturadas mediante la acción de imanes, durante 30 minutos y agitación a temperatura ambiente. El sobrenadante era descartado, y las MBs se recogían en 200 μ L de tampón PBST- 1% BSA y se traspasaban a una placa e 96 pocillos. Tras una etapa de lavado, el complejo MBs-mAb:Analito se resuspendía en 100 μ L/pocillo de una disolución de mAb-B

preparada en PBST-1% BSA, durante 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Tras la realización de una etapa de lavado, el complejo MBs-mAb:Analito:mAb-B se resuspendía en 100 μL /pocillo en la disolución correspondiente de SAV-pHRP, preparada en PBST-1% BSA, durante 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Finalmente, y tras una última etapa de lavado, las MBs se resuspendían en 50 μL de tampón citrato y se depositaban sobre los electrodos serigrafiados de carbono, que ya contenían 50 μL de tampón citrato, capturándolas mediante la aplicación de un campo magnético, para realizar las medidas con detección amperométrica, mediante la adición del sustrato.

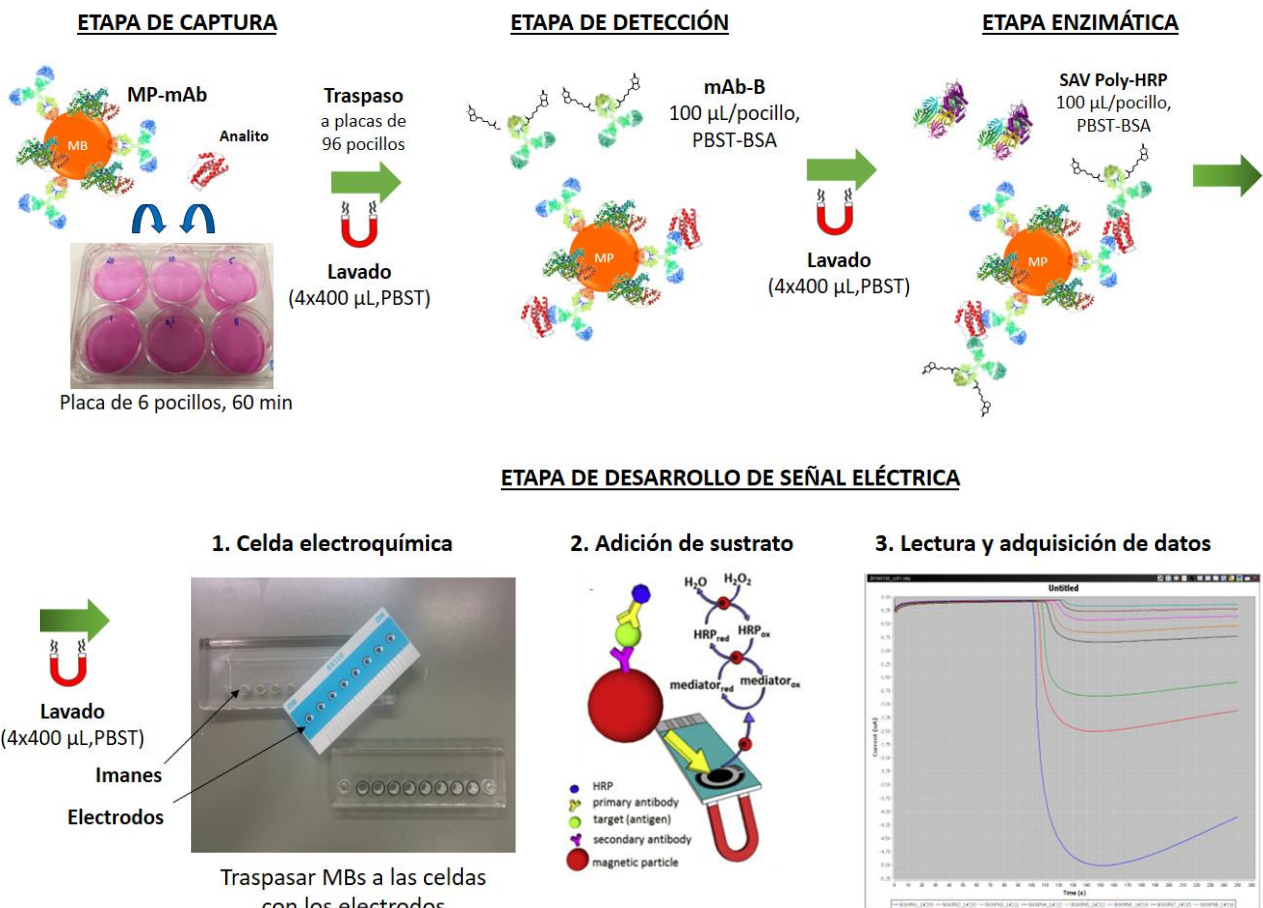


Fig. 3. Esquema del ensayo.

La optimización de la concentración de los diferentes inmunorreactivos se realizó de forma secuencial. En todos los casos se escogió aquella concentración de inmunorreactivo correspondiente a la saturación de la señal (ver figura 5). Así mismo,

para todos los ensayos, la primera etapa del inmunoensayo, etapa de captura, se realizó en placas de 6 pocillos, en medio de diferenciación y con 3 mL de medio en cada pocillo. Se trabajó en este tipo de placas porque en los ensayos de difusión posteriores a la optimización, y los futuros ensayos con el constructo 3D, se trabajarían con *transwells* en placa de 6 pocillos.

De este modo, se optimizó inicialmente la cantidad de partículas magnéticas, para esto se probaron diferentes cantidades de partículas, de 20 a 0 µg/pocillo. Éstas se incubaron con el biomarcador correspondiente a una concentración constante de 4 ng/mL durante 1 h a 37 °C y bajo agitación suave, 300 RPM. Seguidamente, las partículas magnéticas se capturaron durante 30 min y bajo agitación constante, 700 RPM. Seguidamente se retiró el sobrenadante, y las MBs se resuspendieron en 200 µL de PBST-1% BSA y se trasvasaron a una placa de 96 pocillos. El cambio de formato de las placas se debe a que, al disponer de un limpiador de placas de 96 pocillos, esto facilitaba las etapas de lavado y reducía el error humano cometido en cada paso. Seguidamente, las MBs se resuspendieron en 100 µL de una disolución de mAb-B a una concentración de 1µg/mL durante 30 minutos a 500 RPM y temperatura ambiente. Finalmente, tras otra etapa de lavado, las partículas magnéticas se resuspendieron en 100 µL de una disolución de SAV-pHRP a una concentración de 0,25µg/mL. Transcurrido este tiempo, se volvió a realizar una etapa de lavado y las MBs se resuspendieron en 50 µL de tampón citrato 0.04 M – 0.1 M KCl pH 5.5 y se depositaron en la celda electroquímica que ya contenía 50 µL de tampón de medida por pocillo. Finalmente, se realizaron las medidas amperométricas bajo las siguientes condiciones detalladas más adelante, y tras la adición del sustrato se registró la diferencia de señal respecto al ruido de fondo. Posteriormente estos datos eran tratados en Excel y *Graph Prism 5*.

Una vez fijada la cantidad de partículas magnéticas a emplear en el ensayo, se siguió el mismo procedimiento experimental explicado anteriormente para determinar la concentración óptima tanto de mAb-B, así como de SAV-pHRP, siguiendo el mismo procedimiento experimental. Para mAb-B y SAV-pHRP se experimentó dentro de un rango de 1-0 µg/mL.

Los resultados obtenidos para cada paso de optimización y para el ensayo de cada biomarcador pueden verse en la Figura 5a para la IL-6 y 5b para la TNFα.

Rectas de calibrado

Tras la optimización de las diferentes concentraciones de inmunorreactivos, se procedió a la construcción de las rectas de calibrado para cada biomarcador. Inicialmente se mezclaron en placas de 6 pocillos, diferentes concentraciones del biomarcador, partiendo de 0.5 ng/mL se realizaron 6 diluciones, incluyendo el 0, con la cantidad establecida de MBs. Seguidamente, se procedió de igual forma a la descrita anteriormente, y se realizaron las diferentes etapas de incubación a las concentraciones tanto de mAb-B y SAV-pHRP optimizadas para cada caso. Se realizó una réplica para cada analito.

Los resultados se pueden observar en la figura 6a para la IL-6 y 6b para la TNF α .

Detección amperométrica

Tras resuspender las MBs en tampón citrato, se capturaron sobre el electrodo de trabajo mediante el uso de imanes, y cuando la señal se estabilizaba (transcurridos 100s), se añadieron 20 μ L/pocillo del correspondiente sustrato (976 μ L de tampón citrato, 8 μ L de H₂O₂ 1% y 16 μ L de TMB 6 mg/mL) para observar el cambio de corriente producida. Los parámetros de medida de la detección amperométrica son los siguientes:

- teq: 3s
- E: -0,2 V
- Intervalo: 0.5 s
- Tiempo: 500s

La intensidad de esta corriente registrada es directamente proporcional a la concentración de enzima, que, a su vez, es directamente proporcional a la concentración del biomarcador capturado y presente en la muestra. En la figura 4 se puede observar un esquema del proceso descrito.

Finalmente, los datos se registraron mediante el software *DropView 8400* y el tratamiento de datos en cada caso se realizó mediante el uso de *GraphPad Prism 5*.

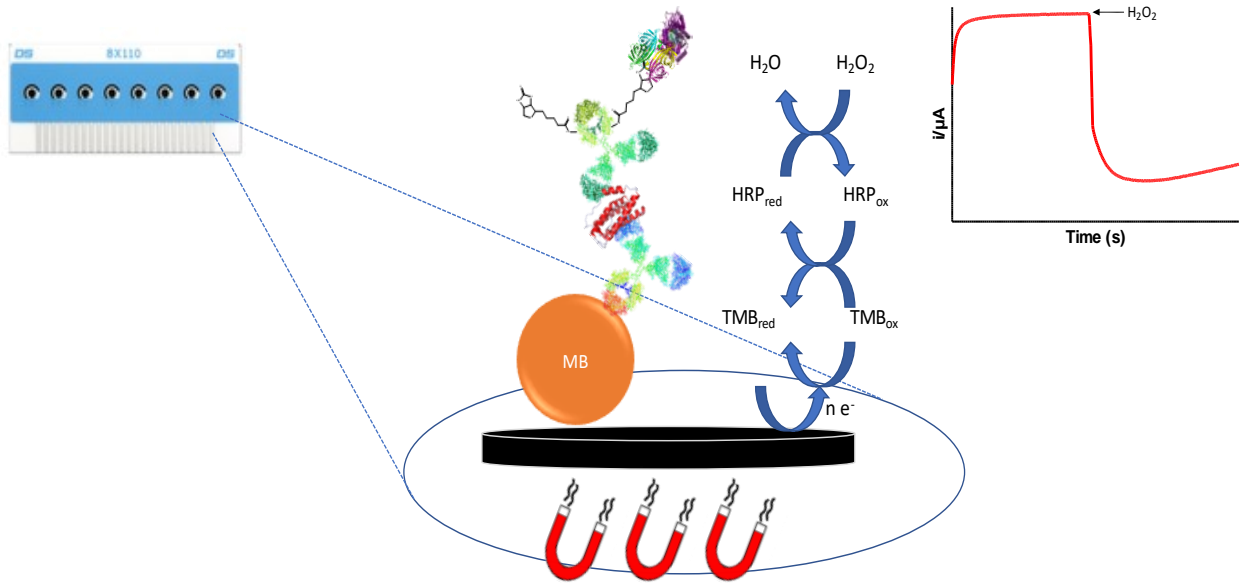


Fig. 4. Esquema general del ensayo donde se detallan los diferentes pasos seguidos, desde la etapa de captura del biomarcador hasta la obtención de la señal electroquímica

Resultados y discusión

Conjugación de las partículas magnéticas

Tras la preparación de los bioconjugados MBs-mAb, el rendimiento del procedimiento se estableció mediante ensayo de proteínas Bradford, tal y como se ha descrito anteriormente. En todos los casos, el rendimiento fue de $55 \pm 3\%$.

Finalmente, la funcionalidad de los bioconjugados se evaluó mediante los diferentes ensayos de optimización que a continuación se describen.

Optimización de la concentración de los inmunorreactivos

En la figura 5 se muestran los resultados para cada paso de optimización y para cada uno de los biomarcadores, IL6 y TNF α .

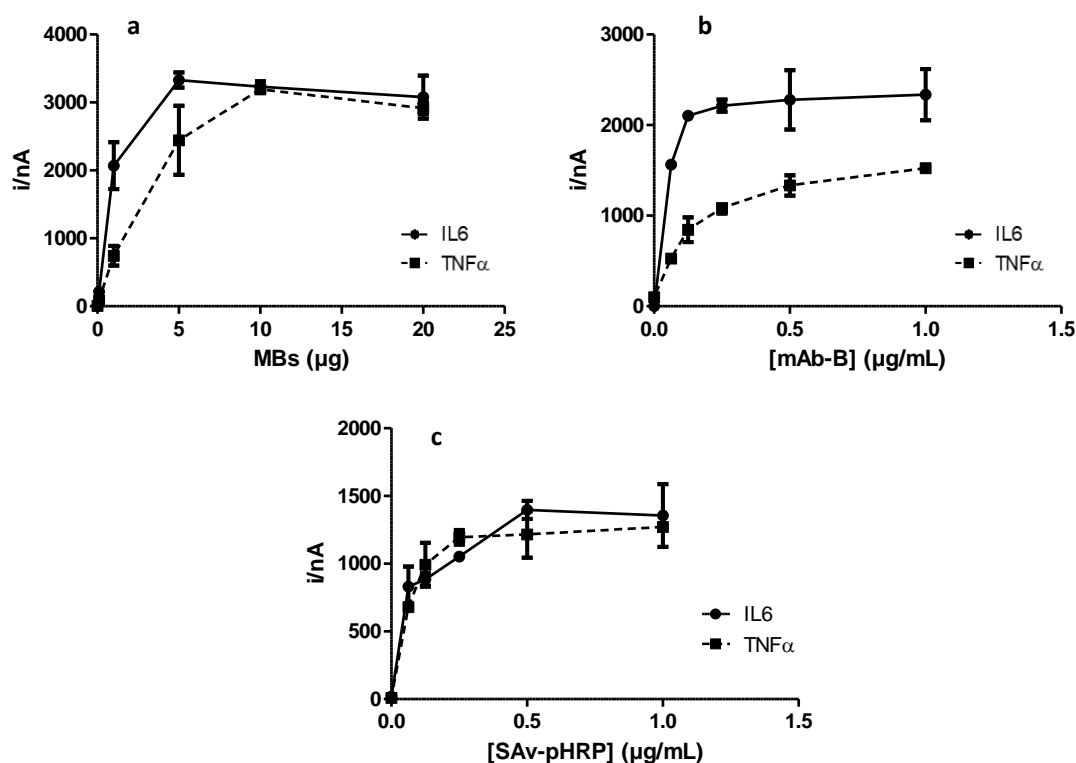


Fig. 5. Optimización de la concentración los diferentes inmunorreactivos a) Ensayo de optimización de la cantidad de MBs para cada biomarcador. Se evaluaron diferentes cantidades, de 20 a 0 μg . En todos los casos, la concentración del biomarcador fue de 4 ng/mL, la del anticuerpo biotinilado, de 1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración de SAV-pHRP fue de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. b) Ensayo de optimización de la concentración de mAb-B. Se evaluaron diferentes concentraciones del bioconjugado, de 1 a 0 $\mu\text{g/mL}$, a una concentración constante de biomarcador de 4 ng/mL. La concentración de SAV-pHRP utilizada fue de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. c) Optimización de la concentración de SAV-pHRP. Se estudiaron diferentes concentraciones del trazador enzimático, de 1 a 0 $\mu\text{g/mL}$ a una concentración constante de biomarcador de 4 ng/mL.

Las concentraciones óptimas se determinaron tras observar el punto de saturación para cada caso. La cantidad de MBs establecida como óptimas para la IL6 y para la TNF α , fue de 5 y 10 μ g, respectivamente. En el caso de la optimización de mAb-B para IL-6, entre 0,125 y 0,25 μ g/mL se observa una diferencia no significativa, por lo tanto, se escoge el punto de menor concentración ya que aproximadamente es la misma señal y así se economizaba en inmunorreactivos. Para TNF α la concentración de mAb-B se estableció en 0,5 μ g/mL. Una vez fijados estos parámetros, se estableció la concentración óptima de SAV-pHRP, siendo de 0.25 μ g/mL para ambos biomarcadores.

Rectas de calibrado

Una vez fijadas las concentraciones óptimas para cada inmunorreactivo se procedió a la construcción de las rectas de calibrado y el estudio de la dosis-dependencia en cada caso.

En la figura 6 se muestran las diferentes calibraciones obtenidas para cada biomarcador.

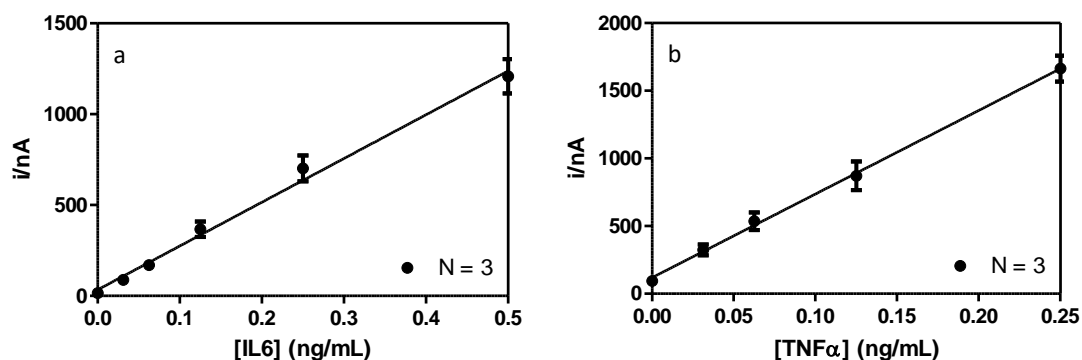


Fig. 6. Rectas de calibrado para a) IL-6 y b) TNF α , desarrollada en el inmunosensor amperométrico previamente optimizado. Cada punto se realizó con su correspondiente réplica. Datos correspondientes al promedio de tres días diferentes

En la Tabla 1 se muestran los diferentes parámetros analíticos para cada calibración.

Tabla 1. Parámetros analíticos para cada uno de los inmunoensayos desarrollados para cada biomarcador. Se incluyen los valores de los mismos parámetros obtenidos anteriormente por ensayo ELISA. Los valores entre paréntesis hacen referencia al coeficiente de variación para cada parámetro, expresado en %.

	IL6		TNF α	
	ELISA ^a	IA ^b	ELISA ^e	IA
Pendiente	0.160 \pm 0.040 (25)	2052.3 \pm 174.1 (8)	0.497 \pm 0.012	5136.7 \pm 945.8 (38)
Ordenada	0.076 \pm 0.005 (6)	50.6 \pm 32.2 (63)	0.49 \pm 0.01	163.0 \pm 82.7 (51)
R²	0.996 \pm 0.002 (0.2)	0.977 \pm 0.009 (1)	0.993	0.921 \pm 0.069 (7)
^cLOD (ng/mL)	0.057 \pm 0.022 (39)	0.036 \pm 0.011 (31)	0.038	0.022 \pm 0.017 (78)
^dLOQ (ng/mL)	0.190 \pm 0.074 (39)	0.119 \pm 0.036 (31)	0.147	0.085 \pm 0.052 (61)

^aELISA, Enzyme Linked-Immunosorbent Assay

^bIA, Inmunoensayo Amperométrico

^cLOD, límite de tección calculado como $LOD = X_{b1} + 3S_{b1}$, siendo X_{b1} el promedio de los blancos, y S_{b1} la desviación estándar asociada a esos blancos

^dLOQ, límite de cuantificación, calculado como $LOQ = X_{b1} + 10S_b$

^eparámetros analñiticos del ELISA para la TNF α correspondientes a un solo día

El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), son dos datos importantes que calcular para poder validar el ensayo. Entendemos por LOD a la concentración mínima del analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Mientras que LOQ es la concentración más baja del analito en la muestra que puede ser determinada con una precisión aceptable. Para poder calcular LOD y LOQ, se realiza por determinación de blancos. Esto es utilizado cuando el análisis del blanco da resultados de desviación estándar diferente a cero.

En el caso de TNF α se detecta un menor LOQ, el cual se podría cuantificar a partir de una menor concentración. Sin embargo, el proyecto no se centra en poder cuantificar la menor cantidad de analito posible, sino en evidenciar la presencia de éste y poder establecer que existen diferencias en estos niveles bajo diferentes escenarios. Además, en comparación con los valores reportados en la bibliografía, los valores medidos de estos biomarcadores bajo procesos diferentes de estimulación están un orden de magnitud por encima de los establecidos en el trabajo de Nedachi, T. *et al.* (2008).

No obstante, el coeficiente de variación (CV), está por encima de lo que es aceptable en inmunosensores para poder determinar que el ensayo es fiable, establecido en un 30%. Esto es debido a los pocos ensayos de este tipo que se llevaron a cabo. Cabe destacar que el ensayo también conlleva mucha manipulación por parte del investigador, por lo tanto, el factor humano podría ser una gran contribución a la gran variabilidad obtenida.

Limitaciones

La primera complicación fue la captura de las partículas magnéticas una vez incubadas con el analito para poder traspasarlas a una placa de 96 pocillos. Inicialmente, de cada pocillo de la placa de 6 pocillos se extraían tres veces 1mL y se traspasaban en tubos eppendorf de 2mL, teniendo tres tubos de cada pocillo. Posteriormente se sometía estos tubos a un campo magnético para capturar las MBs y retirar el sobrenadante. Finalmente, se resuspendían con PBST BSA 1% para traspasarlos a la placa de 96 pocillos. Se trataba de un proceso laborioso y poco efectivo. Por lo tanto, se diseñó una placa con imanes y polidimetilsiloxano (PDMS) (ver figura 7), la cual se encajaba en la placa de 6 pocillos y se agitaba 30 minutos para capturar todas las partículas de todos los pocillos.

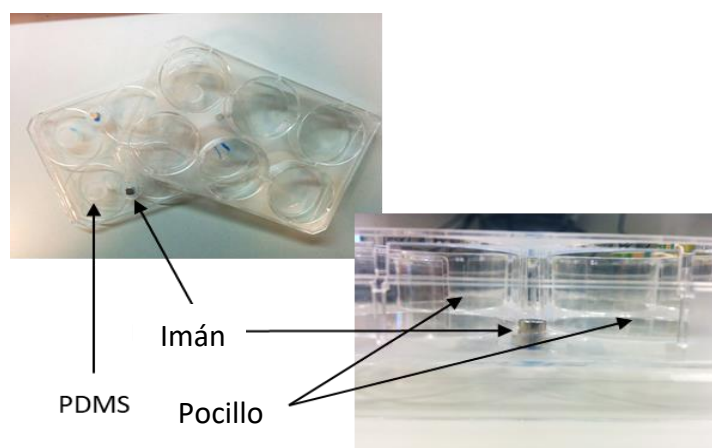


Fig. 7. Sistema diseñado para la captura de MBs.

Durante las rectas de calibrado se observó un comportamiento inusual de las partículas, éstas se enganchaban en las paredes de las puntas de las pipetas y se agregaban al fondo de los pocillos con rapidez, además no mostraban dependencia del analito. La primera hipótesis que podía explicar este comportamiento era el deterioro de las propias MBs. Por ello, se realizó un experimento en los que se incubaban diferentes MBs e inmunorreactivos, el analito y el anticuerpo biotinilado concretamente, tal como muestra la figura 8 de forma esquematizada, para comprobar que el error eran las partículas y no otros inmunorreactivos empleados. Con este experimento se pudo corroborar que el problema estaba causado por las partículas conjugadas, y no por el anticuerpo biotinilado o el analito. Observando la figura 9, podemos ver que, tanto con la presencia de analito como en su ausencia, la señal es la misma. Esto es debido a que las partículas estaban en mal estado. Por ello, se prepararon nuevas con un nuevo stock de buffers.

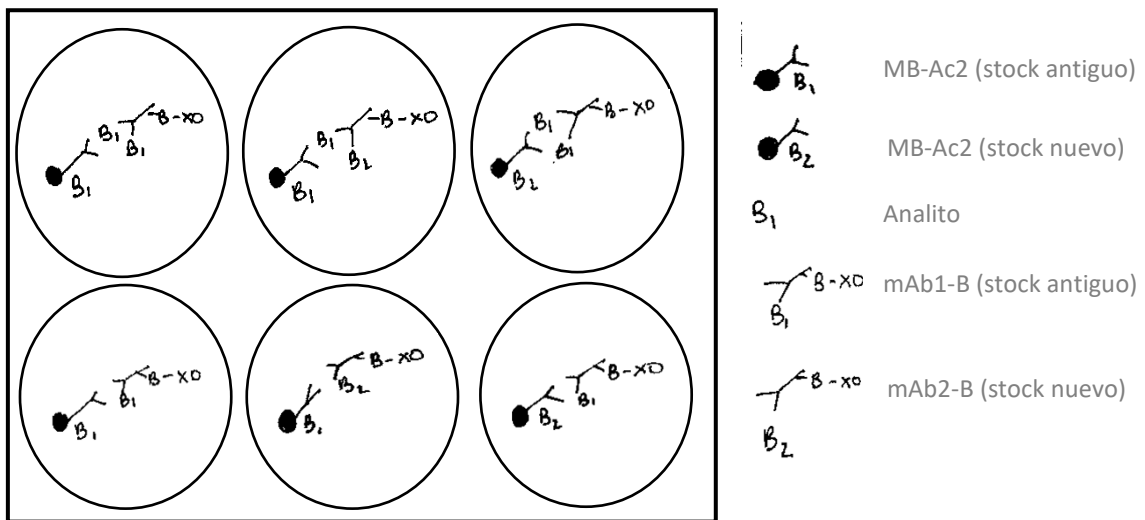


Fig. 8. Esquema del ensayo para comprobar el estado de los inmunorreactivos.

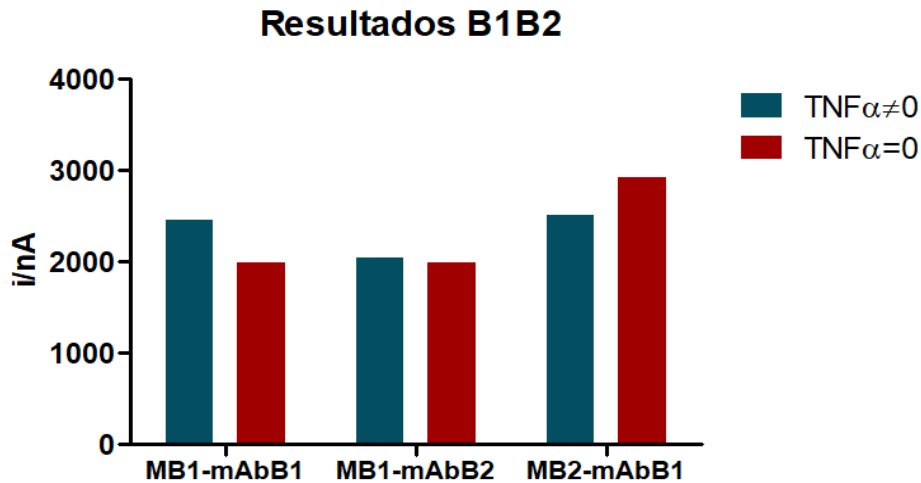


Fig. 9. Resultados del ensayo para comprobar el estado de los inmunorreactivos.

Posteriormente, también se observó una señal mucho menor en las partículas conjugadas para TNF α en comparación con IL-6. La primera hipótesis fue si el tipo de bloqueo de las partículas no era el adecuado en ese ensayo, por ello se experimentó con diferentes bloqueos: BSA, EtAm y mPEG. Simultáneamente, se hizo una réplica en la misma placa, una empleando SAV-pHRP y la otra utilizando SAV HRP. Se experimentó añadiendo analito (TNF α) (b1), sin analito (b2) y sin analito ni anticuerpo biotinilado (b3) (ver figura 10).

En este caso se realizó un ensayo para detectar la cantidad de anticuerpos restantes en cada pocillo después de la inmovilización del anticuerpo sobre las partículas magnéticas. Para ello se empleó el método Bradford, el cual absorbe a 595nm.

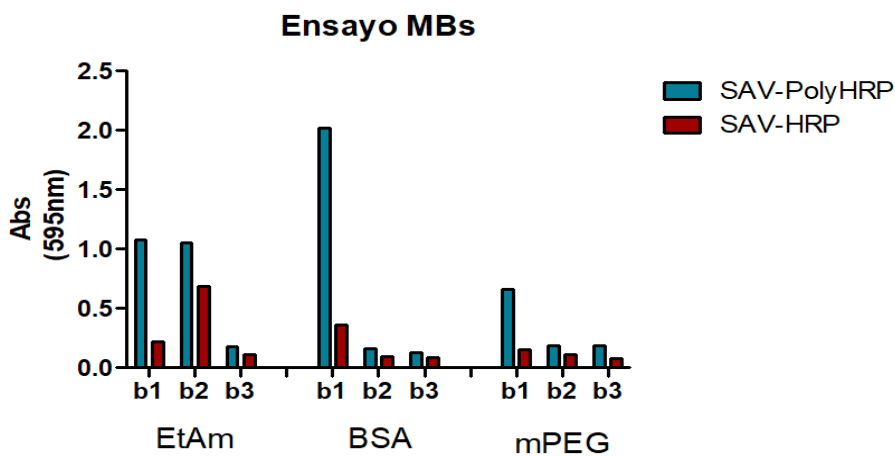


Fig. 10. Resultados de absorbancia (595nm) de MBs con diferentes bloqueos: EtAm, BSA y mPEG. E incubación con SAV-pHRP y Sav HRP.

Esto indicó que el bloqueo actual, BSA, era el adecuado. Ya que muestra el doble de absorbancia que bloqueando las partículas con EtAm o mPEG cuando el analito y mAb-B están presentes (b1). Observando los resultados, se conjugaron nuevas partículas con BSA.

Otra limitación fue el tiempo de captura de las MBs de $TNF\alpha$. Al trabajar con el doble de cantidad, $10\mu g$, en comparación con IL-6 se planteó si necesitaban más tiempo para poder recogerlas todas posterior a la incubación con el analito. Por ello, se diseñó un experimento para medir de forma indirecta cuántas partículas había a diferentes tiempos (0, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos), se realizó para las partículas de IL-6 y $TNF\alpha$ para poder compararlo.

Las posteriores etapas eran las mismas y en vez de realizar una detección amperométrica, se realizó una transducción colorimétrica. En este caso, se utilizó un anticuerpo secundario anti-rata con HRP y se empleó H_2SO_4 para detener la reacción enzimática y poder realizar la medida. La absorbancia es $450nm$ ya que es la longitud de onda a la que absorbe el TMB, sustrato de la enzima HRP.

El resultado (ver figura 11) muestra que el tiempo de captura de MBs es el mismo que el de IL-6. Por lo tanto, a pesar de tener mayor cantidad, no es necesario invertir más de 30 minutos en este paso.

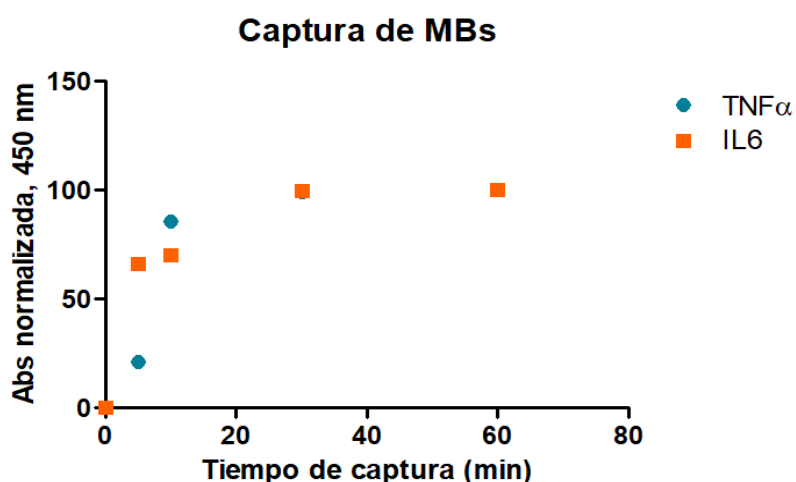


Fig. 11. Resultados de la absorbancia de MBs a diferentes tiempos. La absorbancia se ha normalizado porque se trabajó con diferentes concentraciones de mAb-B y SAV-pHRP en el experimento de IL-6 y $TNF\alpha$.

Conclusiones

Se ha contribuido al desarrollo de un sistema de detección *in situ* a base de partículas magnéticas, fácilmente manipulables. La sensibilidad del inmunoensayo electroquímico ha sido optimizado con la cantidad de MBs, las concentraciones del anticuerpo secundario biotinilado y estreptavidina-polyHRP óptimas, al igual que su tiempo de incubación y captura. Posteriormente, se realizaron rectas de calibrado formadas por un rango de concentraciones variables de los analitos (4-0 ng/mL).

Como el foco de interés se encuentra en la detección, en vez de la cuantificación, los valores de LOD nos muestran cantidades de 0,027 ng/mL para IL-6. Los niveles de estos en personas saludables se encuentran en 0,296 ($\pm 0,203$) ng/mL (Salcedo *et al.*, 2017), por lo tanto, este sistema podría ser capaz de detectar niveles anormales de esta biomolécula. Por lo que respecta TNF α los valores se encuentran en 0,089 ($\pm 0,0484$) ng/mL (Salcedo *et al.*, 2017) y el LOD resultante en este ensayo de 0,015ng/mL también demuestra que se podría detectar niveles de TNF α tanto anormales como niveles de una población sana. A pesar de que el CV sea más alta de lo esperado, se podrían realizar más experimentos con el fin de paliar estos elevados porcentajes.

El sistema desarrollado, se podría emplear para otras moléculas de interés, según lo que queramos detectar. El constructo final a desarrollar permitiría la detección *in situ* de las biomoléculas secretadas por el tejido, por tanto, se trata de un sistema rápido y fiable. No obstante, aún falta desarrollar y optimizar algunos factores como el diseño del constructo en el *transwell* y posiblemente diseñar un mejor sistema para la captura de MBs una vez incubadas con el analito.

Sin embargo, el uso de estas partículas en un formato dinámico promete ser un buen sistema de detección. Con este formato se aprovecha la relación superficie-volumen de las propias partículas magnéticas. El sistema empleado no es muy complejo ya que el uso de la detección electroquímica a través de la reacción, bien caracterizada, de la biotina-estreptavidina es robusta. El uso de anticuerpos asegura una unión específica al analito que queremos analizar.

Future work

El trabajo realizado solo es el principio de un gran proyecto. Una vez realizado la optimización y las rectas de calibrado, las próximas tareas a realizar serían:

- Ensayo de difusión, en el que, como se ha comentado anteriormente, tendría como objetivo estudiar en qué medida se propagan bien los biomarcadores por el futuro tejido muscular y que las MBs sean capaces de captar las biomoléculas en este sistema. Existen dos opciones para realizar este ensayo:
 1. Realizar la incubación con mAb-B y SAV-pHRP en la plataforma de 96 pocillos y posteriormente medir.
 2. Incubar mAb-B y SAV-pHRP en el mismo *transwell* para luego hacer la medida directamente.

Se tendrían que realizar ensayos para comprobar cuál es la forma más efectiva.

- Caracterizar el constructo.
- Estimulación eléctrica del músculo, creando así situaciones de estrés para el tejido y poder detectar la secreción de IL-6 y TNF α . La estimulación también se realizaría a través de presencia de insulina, drogas como la cafeína. Esto tendría como objetivo poder detectar la presencia de los analitos estudiados frente a cualquier droga o fármaco. Con este modelo se podría reducir el uso de animales en laboratorios y poder detectar *in situ* los analitos de interés de forma cualitativa.

Bibliografía

- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
- Junaid, A., Mashaghi, A., Hankemeier, T., & Vulto, P. (2017). An end-user perspective on Organ-on-a-Chip: Assays and usability aspects. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 1, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.02.002>
- Maillard, S. (2016). Physiotherapy Management of Pediatric Rheumatology Conditions. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*, 11, 527–555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63596-9.00025-6>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K., & Serrano, A. L. (2013). Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? *FEBS Journal*, 280(17), 4131–4148. <https://doi.org/10.1111/febs.12338>
- Nedachi, T., Fujita, H., & Kanzaki, M. (2008). Contractile C₂C₁₂ myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295:5, E1191-E1204 <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90280.2008>
- Pacheco, J. G., Barroso, M. F., Nouws, H. P. A., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2016). Biosensors. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, 627–648. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00021-5>
- Riahi, R., Shaegh, S. A. M., Ghaderi, M., Zhang, Y. S., Shin, S. R., Aleman, J., ... Khademhosseini, A. (2016). Automated microfluidic platform of bead-based electrochemical immunosensor integrated with bioreactor for continual monitoring of cell secreted biomarkers. *Scientific Reports*, 6(March), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24598>

- Rodriguez J., G. (2015). Importance of Biosensors. *Biosensors Journal*, 04(01).
<https://doi.org/10.4172/2090-4967.1000e104>
- Salcedo, L. M., Romero, E., García, T., Campos, T. I., Rubio, E. D., Lizardi, A. L., & García, T. A. (2017). Serum levels of IL6, IL17 and TNFa in western Mexico teenagers, 15(1), 1–6. Retrieved from www.e-gnosis.udg.mx
- Salvador, J. P., & Marco, M. P. (2016). Amperometric Biosensor for Continuous Monitoring Irgarol 1051 in Sea Water. *Electroanalysis*, 28(8), 1833–1838.
<https://doi.org/10.1002/elan.201600172>
- Scopus (2018). Scopus. Document search [online]. Disponible en <<https://www.scopus.com/home.uri>> [04 junio 2018]
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 453–472.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4;6(10):a016295.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 1–16.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Zhang, Y. S., Aleman, J., Shin, S. R., Kilic, T., Kim, D., Mousavi Shaegh, S. A., ... Khademhosseini, A. (2017). Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), E2293–E2302.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1612906114>

Autoevaluación

Gracias al desarrollo de este proyecto he podido explorar otros campos de mi carrera que no se estudian, como son los inmunosensores y la química detrás de los mismos. Considero que es un campo que estos últimos años ha ganado mucha importancia y que realmente, no se desarrolla en ninguna de las asignaturas de la carrera de Biotecnología. Personalmente, me ha parecido una gran oportunidad para desarrollar mis conocimientos en biosensores.

He de decir que me hubiese gustado poder participar en las etapas posteriores, que incluyen etapas en las que intervienen la creación de geles y la incorporación de células en estas matrices. Sin embargo, me reconforta saber que la investigación llevada a cabo estos meses serán de utilidad para posteriores hallazgos.

Personalmente, trabajar en un laboratorio que pertenecía a una institución como IBEC y que se encuentra en el Parque Científico, junto a otras grandes empresas, me ha enriquecido a nivel profesional. He podido aprender la dinámica diaria de un laboratorio. Además, gracias a la asistencia a *lab meetings* he visto como diferentes grupos de investigación tenían la oportunidad de presentar sus investigaciones, y así poder recibir las opiniones y consejos de otros profesionales. Por último, me ha ayudado a consolidar los conocimientos previos adquiridos a lo largo de la carrera.