

JORDINA BALAGUER TRIAS

Immunodetecció de IL-6 i TNF- α segregades en múscul esquelètic elèctricament estimulat mitjançant elèctrodes serigrafiats d'or per a muscle-on-a-chip



TREBALL DE FI DE GRAU
BIOTECNOLOGIA

Barcelona / 2018
Dirigit per Javier Ramón Azcón
Tutor acadèmic: Lluís Masip Vernis

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull donar les gràcies a tot l'equip del grup de recerca *Biosensors for Bioengineering*. Especialment, al Dr. Javier Ramón Azcón per donar-me l'oportunitat de realitzar les pràctiques i aquest projecte; i als investigadors postdoctorals María Alejandra Ortega i Alejandro Hernández per tots els coneixements, el suport i la confiança que he rebut des d'un primer moment. També agrair al meu tutor del Treball de Fi de Grau, Lluís Masip, per l'orientació i l'ajuda tècnica, que han estat essencials. I per últim, a la meva mare per fer-me sempre costat.

ÍNDIX

1- Abstract/Resum/Resumen	5
2- Dades del Centre.....	7
3- Introducció	8
3.1- Bioenginyeria	8
3.1.1- Bio-MEMS.....	8
3.1.2- Enginyeria de teixits	9
3.2- Organ-on-a-chip.....	10
3.3- Biosensors	12
3.3.1- Biosensors electroquímics.....	14
3.3.2- SPGE.....	14
3.4- Detecció amperomètrica	15
3.5- Citocines.....	16
3.5.1- Interleuquina-6.....	17
3.5.2- Factor de necrosi tumoral alfa.....	17
3.6- Múscul esquelètic.....	18
3.7- DAMOC	18
4- Hipòtesi i objectius.....	20
5- Metodologia.....	21
5.1- Equips i materials	21
5.2- Reactius i immunoreactius.....	22
5.3- Tampons i solucions	22
5.4- Protocol.....	23
5.5- Optimització dels immunoreactius.....	24
5.5.1 Anticòs de Captura	25
5.5.2 Anticòs Biotinilat.....	25
5.5.3 Bioconjugat SAV-poli-HRP	26
5.6- Elaboració de corbes de calibrat	26
5.7- Anàlisi de mostres del bioreactor	27

6- Resultats i discussió	28
7- Conclusions.....	33
8- Bibliografia.....	35
9- Autoavaluació	39
10-Annexos.....	40
Annex I – Especificacions dels SPGE de Dropsens.....	40
Annex II – Especificacions del potenciòmetre de Dropsens	41
Annex III – Especificacions dels connectors de Dropsens.....	43
Annex IV – Especificacions de la cel·la de fluidica de Dropsens	44
Annex V – Fitxa de seguiment del tutor	45

1- Abstract/Resum/Resumen

Nowadays, *in vivo* animal models and *in vitro* cell models are the basis for the discovery of new drugs and essential for the conduct of clinical trials. These, however, entail ethical problems such as experimentation with animals and difficulties in extrapolating the results to human conditions because of the differences between species. Instead, the combination of the modified tissues with biosensors, in *organ-on-a-chip* devices, allows to detect the cellular response to external stimuli mimicking the real environment of the tissue *in vivo*.

The aim of this project has been the development of an electrochemical biosensor for the detection of interleukin-6 (IL-6) and of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) secreted in skeletal muscle by gold-screened electrodes with the idea of using them in the *muscle-on-a-chip* type device.

Avui en dia, els models animals *in vivo* i els models cel·lulars *in vitro* són la base del descobriment de nous fàrmacs i imprescindibles per a la realització d'assajos clínics. Aquests però comporten problemes ètics com l'experimentació amb animals i dificultats a l'hora d'extrapolar els resultats a condicions humanes degut a les diferències entre les espècies. En canvi, la combinació dels teixits modificats amb biosensors, en dispositius tipus *organ-on-a-chip*, permet detectar la resposta cel·lular a estímuls externs mimetitzant l'entorn real del teixit *in vivo*.

L'objectiu d'aquest projecte ha estat el desenvolupament d'un biosensor electroquímic per la detecció d'interleuquina-6 (IL-6) i del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) segregats en múscul esquelètic mitjançant elèctrodes serigrafiats d'or amb la finalitat de que siguin utilitzats en el dispositiu tipus *muscle-on-a-chip*.

Hoy en día, los modelos animales *in vivo* y los modelos celulares *in vitro* son la base del descubrimiento de nuevos fármacos e imprescindibles para la realización de ensayos clínicos. Estos pero conllevan problemas éticos como la experimentación con animales i dificultades a la hora de extrapolar los resultados a condiciones humanas a causa de las diferencias entre especies. En cambio, la combinación de los tejidos modificados con biosensores, en dispositivos tipo *organ-on-a-chip*, permite detectar la respuesta celular a estímulos externos mimetizando el entorno real del tejido *in vivo*.

El objetivo de este proyecto ha sido el desarrollo de un biosensor electroquímico para la detección de interleuquina-6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) segregados en músculo esquelético mediante electrodos serigrafados de oro con el fin de que sean utilizados en el dispositivo tipo *muscle-on-a-chip*.

2- Dades del Centre

L'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) és un centre de recerca interdisciplinària dedicat a la investigació d'excel·lència en enginyeria i ciències de la vida. El propòsit de l'IBEC és generar nou coneixement mitjançant la combinació d'àrees com la nanomedicina, la biofísica, la biotecnologia, l'enginyeria de teixits i les aplicacions de les tecnologies de la informació en salut.

L'IBEC va ser fundat l'any 2005 per la Generalitat de Catalunya, la Universitat de Barcelona (UB) i la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

Actualment, l'Institut té 21 grups de recerca i 250 investigadors de procedències diverses, ja que acull a personal de 20 països diferents. La seu es troba a Barcelona, concretament al Parc Científic de Barcelona.

L'estructura de l'IBEC es divideix en 3 branques del coneixement: la nanomedicina, la enginyeria cel·lular-tissular i les tecnologies de la informació i la comunicació (TIC) per a la salut. De la mateixa manera, cada un d'aquests pilars pretén avançar en 3 àmbits: Bioenginyeria per a la medicina del futur, Bioenginyeria per a teràpies regeneratives i Bioenginyeria per a l'envelliment actiu.

En Biosensors for Bioengineering, un dels grups de recerca de l'IBEC, es centren en la integració de la tecnologia de biosensors i la nanotecnologia amb la investigació amb cèl·lules mare i la enginyeria de teixits.



Figura 1. Roser, Q., 2018. Imatge de l'edifici principal del Parc Científic de Barcelona [fotografia]. FONT: Parc Científic de Barcelona.

3- Introducció

Aquest treball descriu el desenvolupament d'un biosensor per a la detecció de dues citocines (IL-6 i TNF- α) en un dispositiu *muscle-on-a-chip*, projecte realitzat durant les pràctiques externes del grau. Per poder comprendre la finalitat d'aquest i contextualitzar-lo es defineixen a continuació tots els aspectes clau relacionats amb dit projecte.

3.1- Bioenginyeria

La Bioenginyeria o enginyeria biològica és una branca de l'enginyeria que utilitza eines, mètodes i principis d'aquesta per a resoldre problemes de les ciències de la vida.

La bioenginyeria es solapa substancialment amb la biotecnologia i les ciències biomèdiques; ja que s'ocupa de l'aplicació tecnològica dels sistemes biològics i dels organismes vius o dels seus derivats per a la creació o modificació de productes o processos per a un ús específic.

Una de les branques en les que es pot dividir aquesta disciplina és l'enginyeria biomèdica, que a la vegada es subdivideix en enginyeria cel·lular i tissular, biomaterials i bio-MEMS.

3.1.1- Bio-MEMS

Els sistemes microelectromecànics (Microelectromechanical Systems, MEMS) també coneguts com a microsistemes, sistemes d'anàlisi total micro (μ TAS), dispositius microfabricats o *lab-on-a-chip* (LOC) existeixen des de fa més de 30 anys (Jivani et al., 2016). Aquests, originalment es van desenvolupar en la indústria de la microelectrònica i consistien en dispositius funcionals a escala micromètrica com sensors, xips microfluídics, interruptors, filtres i engranatges, principalment de silici. Es va observar que la miniaturització de les tecnologies convencionals aportava certs beneficis com un menor cost de producció, menor consum d'energia i menor volum. Característiques molt atractives que van portar al desenvolupament d'aquests sistemes en aplicacions biomèdiques o biològiques (Bio-MEMS) com eines de diagnòstic, monitorització en temps real o assajos de cribratge d'alt rendiment per al descobriment de fàrmacs (Maheshwari et al., 2014).

En el diagrama de la Figura 2 es pot observar la relació d'aquests sistemes entre ells. Qualsevol dispositiu Bio-MEMS es pot dividir en dos: el sensor o actuator, i la resta del sistema, que pot incloure una part electrònica o mecànica. Algunes de les seves principals aplicacions inclouen la genòmica i la proteòmica, entre d'altres. La millor aproximació a la qual s'ha arribat en aquest camp són els dispositius coneguts com a *Organ-on-a-chip*.

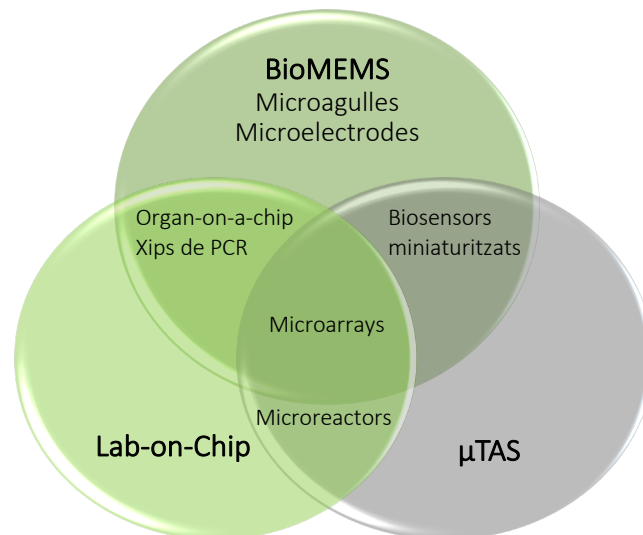


Figura 2: Diagrama tipus Venn on es mostra la interconnexió entre els camps bio-MEMS, lab-on-a-chip, μTAS.

3.1.2- Enginyeria de teixits

L'enginyeria de teixits o enginyeria tissular pretén generar estructures semblants a teixits utilitzant cèl·lules, biomaterials i senyals bioquímics i físics. L'objectiu d'aquesta és proporcionar substituents biològics que puguin mantenir, restaurar o millorar la funció dels teixits danyats.

Les tècniques d'enginyeria de teixits s'utilitzen en altres camps per a obtenir mostres de teixit funcional, com és el cas dels *organ-on-a-chip* i altres aplicacions *in vitro*.

3.2- Organ-on-a-chip

L'enginyeria biomèdica, què com s'ha vist anteriorment és una de les branques de la bioenginyeria, es dedica a fomentar el coneixement en els camps d'enginyeria, medicina i biologia amb el propòsit de millorar les aplicacions clíniques d'aquests i en conseqüència la salut humana (Magjarevic i Diaz, 2014). Dins d'aquesta branca i englobats per l'enginyeria de teixits i els sistemes microelectromecànics biològics (Bio-MEMS), destaquen els *organ-on-a-chip*.

Un *organ-on-a-chip* (OOC) és un dispositiu 3D de cultiu cel·lular que incorpora canals de microfluídica per tal de mimetitzar l'entorn *in vivo* del teixit o òrgan en qüestió. L'objectiu d'aquest no és construir un òrgan sencer sinó la unitat mínima funcional que el representi. Aquesta ha de dur a terme les mateixes funcions fisiològiques que es donen *in vitro*. La necessitat de crear aquests dispositius sorgeix després de comprovar que els cultius cel·lulars de dues dimensions (2D) no poden simular les condicions que es donen en un organisme viu, com per exemple les complexes interaccions homotípiques i heterotípiques cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu, les arquitectures multicel·lulars, el microambient fisicoquímic o la perfusió vascular del cos. En canvi, en un *organ-on-a-chip* es poden incorporar diferents tipus cel·lulars, "cell patterning", compressions mecàniques, tensions cícliques o forces físiques; aspectes crucials per al manteniment de l'estructura i funció del teixit.

La paraula *chip* del seu nom, fa referència al mètode original de fabricació dels microxips d'ordinador, ja què s'utilitzen tecnologies de fabricació de dispositius semiconductors com la fotolitografia o la litografia suau (Bhatia i Ingber, 2014). Aquestes utilitzen polímers líquids, sent el pòlidimetilsiloxà (PDMS) el més comú, i permeten controlar la forma i la mida de la superfície en escala nanomètrica i micromètrica (l'escala cel·lular). Un dels grans avantatges que presenten aquests dispositius és el poder controlar molts paràmetres del sistema, com per exemple el flux del fluid o "el cell patterning". Alguns xips porten integrats sensors que informen sobre l'estat de les cèl·lules cultivades i s'utilitzen per analitzar la integritat del teixit, la migració cel·lular, l'efecte de la pressió del fluid o algunes condicions químiques.

Poder controlar el flux del fluid ha estat de gran utilitat, ja que a petita escala les forces viscoses dominen per sobre de les inercials i el flux és laminar només si el diàmetre del canal de microfluídica és inferior a un mil·límetre (Bhatia i Ingber, 2014). Es pot determinar també la tensió de tall del fluid canviant la velocitat del flux, les dimensions dels canals o separant les cèl·lules del corrent mitjançant una membrana nanoporosa. Així es generen gradients físics i químics útils per a simular el teixit *in vivo* (Junaid et al., 2017, Kimura et al., 2018).

En la figura 3 podem veure el procés que es segueix a l'hora de dissenyar els OOC per tal d'imitar les condicions *in vivo*.

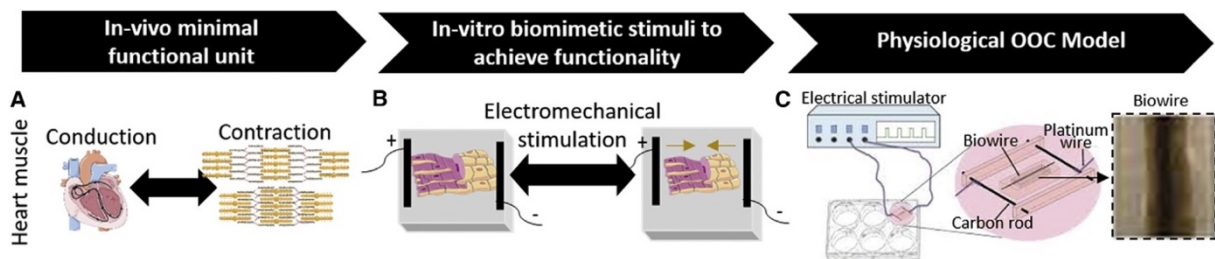


Figura 3. Ronaldson-Bouchard, K., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. [Imatge].

Els *Organ-on-a-chip* són un gran avanç en l'estudi dels mecanismes bàsics de la fisiologia dels òrgans i les seves malalties. De fet, els últims models permeten l'avaluació de compostos candidats a esdevenir fàrmacs. Això ens porta a valorar aquests dispositius com a una bona alternativa a l'experimentació animal en fases preclíniques i per tant, com a una solució no només als problemes ètics que la investigació en animals comporta sinó també per compensar les importants diferències entre ambdues espècies alhora d'extrapolar resultats.

En un futur es pretén desenvolupar un "human-body-on-a-chip" que seria un dispositiu microfluídic format per diverses cambres, representant diferents òrgans, connectades entre elles per tal de provar nous fàrmacs, teràpies, compostos químics o toxines i obtenir resultats comparables als d'un estudi clínic en persones. Seria una gran oportunitat per treballar en agents perillosos (p. ex., virus altament infecciosos, dosis letals de radiació gamma) o assaigs clínics pediàtrics, ja que són casos on la medicina convencional no pot aprofundir. Tot i les grans expectatives que es tenen d'aquests dispositius, els

investigadors reconeixen que hi ha grans obstacles a superar abans de que aquesta tecnologia sigui acceptada per la comunitat científica i s'implanti en centres d'investigació mèdica i hospitals. No obstant, veien el gran salt en aquest camp dels últims 8 anys, es pot ser bastant optimista al respecte (Zhang et al., 2018).

3.3- Biosensors

Els biosensors són dispositius analítics que s'utilitzen per mesurar paràmetres biològics o químics, el seu mecanisme consisteix en convertir la resposta biològica en una senyal elèctrica quantificable. Poden detectar la presència o concentració d'analits biològics o de molècules petites com biomolècules, microorganismes, antibiòtics o pesticides.

Els biosensors ideals han de ser altament específics i no s'han de veure afectats per paràmetres físics com el pH i la temperatura.

Un biosensor es compon de tres parts:

- El sensor biològic: és el component que reconeix l'analit i produeix la senyal. Un exemple són els enzims i els anticossos.
- El transductor: element que tradueix la senyal emesa pel primer.
- Un dispositiu de lectura: és l'electrònica associada que tracta la senyal per tal de poder interpretar i visualitzar millor els resultats.

El component essencial del biosensor és per tant la capa compacta que actua com a element de reconeixement biològic, aquesta es troba molt a prop del transductor i en ella s'hi adhireixen les molècules diana. La immobilització d'aquestes molècules és crucial en el disseny del sensor ja que condicionen varis aspectes com el límit de detecció, l'especificitat i la fiabilitat d'aquest. L'estratègia d'immobilització consisteix en formar capes estables en la superfície del sensor, conservar l'activitat de les molècules que la formen i la seva disponibilitat. Els mètodes físics d'immobilització de proteïnes o anticossos a la superfície poden provocar pèrdua de l'activitat de les molècules degut a qüestions d'orientació, ja que el lloc d'unió de la molècula diana no sempre queda exposat a la superfície i això provoca una pèrdua de sensibilitat. La solució a aquest problema és utilitzar una molècula que actuï com a braç espaiador entre la superfície i

l'element de bioreconeixement. Per a què aquest enllaç sigui possible i exitós cal preparar primer la superfície, a vegades inclús modificar-ne les seves propietats.

El següent pas, una vegada immobilitzat l'element de bioreconeixement, és bloquejar els llocs de la superfície que han quedat lliures per minimitzar les possibles adsorcions no específiques. Hi ha diversos mètodes en funció de la naturalesa i estructura de la superfície (Ali et al., 2017, Chen i Shamsi, 2017, Maheshwari et al., 2014).

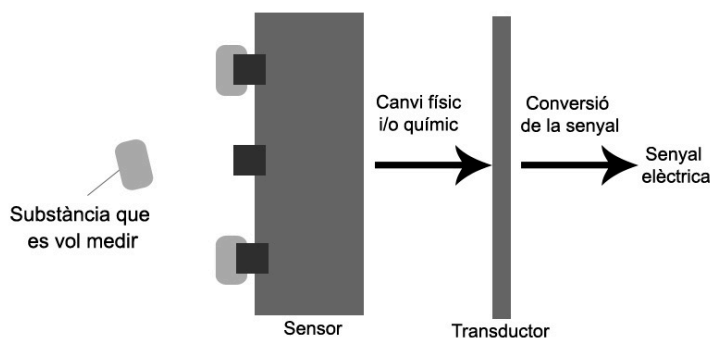


Figura 4. Mecanisme i parts d'un sensor

Els biosensors es poden classificar en base a diferents criteris, els més comuns:

- En funció del material amb el que es fabriquen: microfabricacions a partir de silici i vidre, biomaterials (proteïnes i cèl·lules) i polímers (PMMA, PDMS, ...)
- En funció al sistema de transducció: òptics, elèctrics/electroquímics i mecànics

Els biosensors fabricats en escala micromètrica formen part dels ja explicats sistemes bio-MEMS, els quals s'ha vist que tenen moltes aplicacions, una de les més innovadores és integrar els biosensors en un xip per tal d'obtenir informació del que passa en el interior d'aquests.

Quan parlem d'immunosensors fem referència a aquells biosensors que tenen com a element de reconeixement un anticòs o fraccions d'aquest, un antigen o un haptè; sent aquests per tant els que detecten el biomarcador cel·lular (Mehrotra, 2016).

3.3.1- Biosensors electroquímics

Els biosensors electroquímics són aquells que utilitzen un elèctrode com element de transducció i en els quals la senyal transformada és el resultat de la interacció electroquímica entre l'analit i l'elèctrode. Aquesta interacció produeix un canvi en les propietats elèctriques de la solució que s'utilitza com a paràmetre de mesura.

Aquest tipus de sensors es poden classificar en amperomètrics, potenciomètrics, conductomètrics o impedimètrics segons la tècnica electroquímica utilitzada per a obtenir la informació de la mostra.

3.3.2- SPGE

SPGE són les sigles de *Screen-Printed Gold Electrodes*, és a dir, elèctrodes serigrafiats d'or. Aquests elèctrodes s'utilitzen com a transductors de biosensors electroquímics i destaquen per ser sistemes *low-cost* d'un sol ús dissenyats per a realitzar anàlisis electroquímics de mostres en microvolums. La seva cel·la electroquímica està formada per un elèctrode de treball d'or, un elèctrode auxiliar (counter) d'or i un elèctrode de pseudoreferència de plata (Ag/AgCl). Els contactes elèctrics també estan fets de plata.

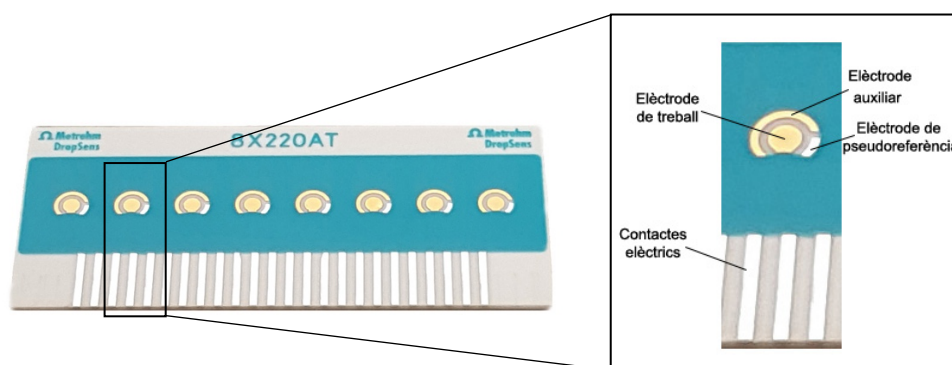


Figura 5. Parts de la cel·la electroquímica d'una obla de SPGE de Dropsens model 8x220AT.

L'or és un dels materials més utilitzats en biosensors degut a la seva naturalesa inerta, bona superfície reflectora, bones propietats elèctriques i excel·lent biocompatibilitat amb les proteïnes. El mètode més utilitzat per a l'acoblament de molècules biològiques a la superfície de l'or és la formació de monocapes autoensamblades (Self-assembled monolayers, SAM) de tiols, polielectròlits, biotina o proteïna A amb polímers (Maheshwari et al., 2014).

L'ús d'elèctrodes d'or com a transductors en biosensors és molt comú en treballs d'investigació. En un principi s'utilitzaven elèctrodes convencionals però aquests tenien limitacions, la solució va ser adaptar la tècnica del serigrafiat de l'enginyeria electrònica per a produir circuits impresos al camp dels sensors.

Les avantatges del canvi eren: gran flexibilitat del disseny, automatització del procés de producció, gran varietat de tintes de serigrafiat i la possibilitat d'adaptar els elèctrodes en suports molt diversos.

3.4- Detecció amperomètrica

La detecció amperomètrica és una tècnica electroquímica que es basa en el consum i/o generació d'espècies electroquímiques durant un procés d'interacció entre una substància biològicament activa i un substrat.

Els sensors amperomètrics mesuren el corrent generat per l'oxidació o reducció d'espècies electroactives mentre es manté un potencial constant. El format de l'assaig pot ser de tipus sandvitx o competitiu. En el primer cas i l'utilitzat en aquest projecte, el corrent que es genera és directament proporcional al consum o generació de les espècies, i a la vegada, directament proporcional a la concentració de l'analit detectat present a la mostra.

Un dels avantatges d'aquests sensors és que són capaços de detectar concentracions d'analit en el rang picomolar. Per contra, estan limitats a només detectar compostos electroquímicament actius. Això vol dir que els components que participen en la reacció, com per exemple el parell antigen-anticòs, han d'estar etiquetats amb una molècula que sigui electroquímicament activa, com ara un enzim (Maheshwari et al., 2014).

En aquest projecte es va treballar amb els SPGE, mencionats en el apartat anterior, i es van dur a terme deteccions amperomètriques com a pas final per a obtenir una lectura dels resultats.

En la figura 6 podem veure un exemple de lectura dels resultats d'una detecció amperomètrica on s'aprecia perfectament el canvi en la intensitat de la senyal després de l'addició del substrat.

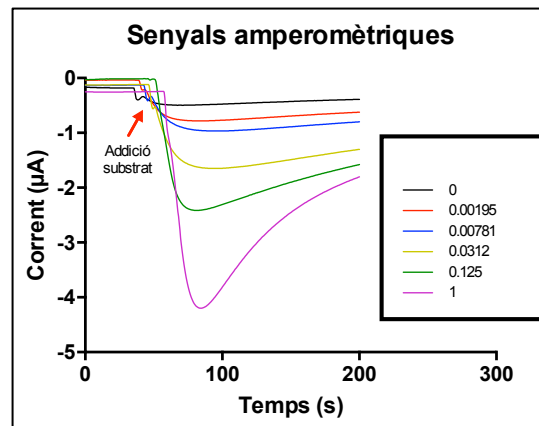


Figura 6. Representació corrent versus temps de la senyal de les mostres a diferents concentracions de IL-6 en una detecció

3.5- Citocines

Les citocines són proteïnes senyalitzadores que tenen un paper molt important en la comunicació i interacció cel·lular. Són molècules petites, menys de 80kDa en general, que secreten principalment les cèl·lules del sistema immunitari per tal de regular multitud de respostes immunitàries, incloent la proliferació, migració o activació cel·lular.

Aquestes petites glicoproteïnes reconeixen i s'uneixen a receptors específics de la membrana de les cèl·lules on han de dur a terme la seva funció, la seva unió provoca que les cèl·lules diana adoptin un comportament biològic determinat. La producció de citocines acostuma a ser transitòria i limitada al temps que dura l'estímul. La seva acció pot afectar només a les cèl·lules que les han secretat, autocrina, a cèl·lules properes, paracrina, o a cèl·lules distants, endocrina.

Quan diferents tipus cel·lulars secreten la mateixa citocina o quan una citocina actua en diferents tipus cel·lulars diem que aquesta és pleiotròpica. Mentre que quan diferents citocines exerceixen un mateix efecte parlem de redundància. També es pot donar la situació de que una citocina potencia l'efecte d'una altra o en el cas contrari, la bloqueja o inhibeix. Llavors parlem de sinergisme o antagonisme, respectivament.

Es creu que aquestes molècules senyalitzadores poden estar relacionades amb la inflamació crònica i amb les malalties degeneratives, ja que desafortunadament quan hi ha una resposta excessiva poden danyar el teixit. De fet, hi ha abundants evidències de que algunes citocines proinflamatòries com la IL-1, IL-6 o TNF- hi estan involucrades (Turner et al., 2014, Holdsworth i Can, 2015).

3.5.1- Interleuquina-6

La interleuquina-6 (IL-6) és una citocina pleiotròpica secretada per diversos tipus cel·lulars, principalment macròfags, cèl·lules T, cèl·lules endotelials i fibroblasts. Tot i que destaca per ser una potent inductora de la inflamació, té efectes tant proinflamatoris com antiinflamatoris. Intervé regulant la resposta immunològica, la hematopoesis i les reaccions de fase aguda (Tanaka et al., 2014).

Una altra característica rellevant de la IL-6 és que s'ha vist que està relacionada amb varis processos de les cèl·lules de múscul esquelètic com per exemple la proliferació i diferenciació *in vitro*, la regeneració de fibres adultes danyades, atrofia i hipertrofia, entre altres (Bustamante et al., 2014).

3.5.2- Factor de necrosi tumoral alfa

El factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) és una de les citocines proinflamatòries multifuncionals més potents. És produït principalment per macròfags, però també pels limfòcits T, les cèl·lules NK i els neutròfils.

S'ha observat que estimula la producció d'altres citocines com la IL-1, la IL-6 o la IL-8 i sovint s'utilitza com a biomarcador per a diversos processos fisiològics i patològics com la mort cel·lular per apoptosi, la febre o la caquèxia.

La seva funció més destacada és l'acció citotòxica contra les cèl·lules tumorals gràcies a què inhibeix la angiogènesi i augmenta la resposta immunitària antitumoral.

Elevades concentracions de TNF- α estan relacionades amb varies malalties com:

l'artritis, la psoriasi, el càncer, infeccions de VIH i la diabetis (Arya i Estrela, 2017, Yagati et al., 2018).

3.6- Múscul esquelètic

El múscul esquelètic és un tipus de múscul estriat responsable de generar el moviment del cos. Aquest està constituït per cèl·lules allargades i polinucleades que es troben unides a l'esquelet creant llargues fibres cilíndriques. Destaca la seva relació amb les proteïnes miosina i actina, responsables de la contracció muscular, la qual generalment és voluntària. És el teixit més gran del cos humà en quant a massa, ja que compren el 40% del total de la massa corporal d'individus sans (Agrawal et al., 2017). Degut a això, és el responsable del balanç de la glucosa depenent d'insulina, ja que capta més del 80% de la glucosa de tot el cos.

3.7- DAMOC

El projecte DAMOC, Diabetes Approach by Multi-Organ-on-a-Chip, és un projecte finançat per l'ERC (European Research Council) que va acollir l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya al 2017. El PI (Principal Investigator) d'aquest és el Dr. Javier Ramón Azcón del grup de recerca Biosensors for bioengineering de l'IBEC.

L'objectiu d'aquest projecte és la fabricació d'un dispositiu *multi-organ-on-a-chip* que biomimetitzi teixit muscular esquelètic i illots pancreàtics per a l'estudi del metabolisme de la diabetis de tipus 2 (type 2 diabetes, T2D) i per al cribratge de fàrmacs per al tractament d'aquesta malaltia.

Defectes en la secreció d'insulina (hormona que promou l'assimilació de la glucosa produïda en el pàncrees) i en l'homeòstasi normal de la glucosa desencadenen la T2D. Una mala absorció de la glucosa en el múscul esquelètic contribueix a que les cèl·lules del cos es tornin resistents a la insulina, és a dir, que la glucosa no pugui penetrar en les cèl·lules a pesar de la presència de la insulina en sang. Algunes de les citocines alliberades per les cèl·lules musculars, com la interleuquina 6, tenen un efecte rellevant en la autoregulació del metabolisme de la glucosa en el múscul esquelètic. A més, fa uns anys es va demostrar que la inflamació dels illots pancreàtics causava la disfunció en les cèl·lules beta (tipus de cèl·lules del pàncrees localitzades en els illots de Langerhans que produeixen insulina) en la T2D. Ja que com en qualsevol procés inflamatori, es promou el

reclutament de macròfags i la secreció de citocines proinflamatòries tòxiques per a les cèl·lules beta.

La diabetis és una de les malalties metabòliques amb un impacte mundial més alt, afectant al voltant de 347 milions de persones, i en un 90% -95% dels casos es deguda a la hiperglucèmia i la resistència a la insulina. Per això la investigació en ella és tant necessària.

Per poder assolir l'objectiu final del projecte que és un *multi-organ-on-a-chip* s'han dut a terme primer investigacions simultànies per arribar a la millor aproximació de *muscle-on-a-chip* per una banda i *pancreatic islets-on-a-chip* per una altra.

La integració dels teixits amb els biosensors per detectar el consum de glucosa, el metabolisme de la glucosa induïda per la contracció, la secreció d'insulina i la secreció de biomarcadors permetrà recollir molta informació valuosa. Aquesta serà utilitzada a posterior per realitzar proves de fàrmacs i proporcionar noves teràpies per evitar la pèrdua de la massa cel·lular beta associada a T2D i els defectes en la captació de glucosa en el múscul esquelètic.

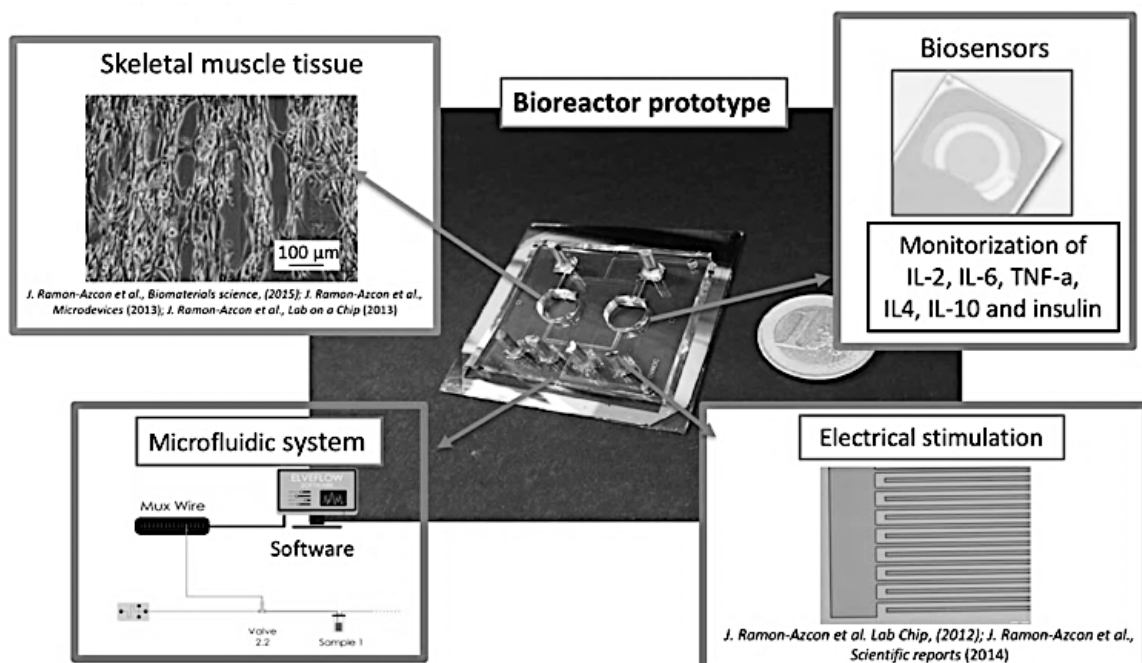


Figura 7. Parts que integren el muscle-on-a-chip [Muntatge fotogràfic].
 FONT: Biosensors for Bioengineering, projecte DAMOC.

4- Hipòtesi i objectius

La hipòtesi d'aquest projecte ha estat que mitjançant l'ús d'elèctrodes serigrafats d'or es podien detectar les citocines IL-6 i TNF- α presents en el medi de cultiu cel·lular de múscul esquelètic d'un dispositiu muscle-on-a-chip.

Aquest treball ha format part de la investigació que es dur a terme al laboratori de Biosensors for Bioengineering de l'IBEC per al projecte DAMOC, explicat en el paràgraf anterior.

Com s'ha comentat, les citocines tenen un paper rellevant en el correcte funcionament del teixit muscular i en conseqüència en l'aparició de la T2D. D'aquí, la importància de desenvolupar un sistema de detecció per a aquests biomarcadors que es pugui integrar amb el *organ-on-a-chip*.

Sent la principal meta desenvolupar immunosensors electroquímics per a la detecció de dites citocines mitjançant elèctrodes serigrafats d'or per a la seva aplicació en *muscle-on-a-chip*, els objectius a assolir dins d'aquest projecte van ser els següents:

- Optimitzar la concentració dels diversos immunoreactius involucrats en la detecció d'ambdues citocines (IL-6 i TNF- α).
- Elaborar corbes de calibrat per a cada biomarcador en condicions fluídiques.
- Analitzar mostres procedents del bioreactor.
- Dur a terme assajos amb el xip connectat *in situ* per tal de corroborar el funcionament del procés de detecció.

5- Metodologia

5.1- Equips i materials

Els elèctrodes que es van fer servir eren els elèctrodes serigrafiats d'or 8x220AT de Dropsens (especificacions en el Annex I) en una cel·la de dues parts de polimetilmetacrilat (PMMA) de vuit pouets, tal i com es mostra en la Figura 8- imatge superior. També es va utilitzar cel·la de flux DRP-FLWCL8X1C de Dropsens per al mateix model d'elèctrodes en format 8x i d'un canal (especificacions Annex IV, Figura 8- Imatge inferior).

La detecció amperomètrica es duia a terme mitjançant un potenciòmetre μ Stat 8000P de Dropsens connectat a un ordinador (especificacions Annex II), sistema que es pot veure en la Figura 9. La interfície en la qual s'introduïen els connectors elèctrics dels elèctrodes era la DRP-CAST8X de Dropsens (especificacions Annex III). La lectura de les diferents respostes es realitzava amb el programa DropView 8400 i les dades obtingudes es tractaven amb GraphPad Prism 6 i Microsoft Excel.

En els experiments en condicions fluídiques es va utilitzar una bomba peristàtica MCP Process ip65 de ISMATEC per a fer circular el fluid.



Figura 8. Imatge superior: Elèctrodes dins la cel·la de PMMA. Imatge inferior: Elèctrodes col·locats en la cel·la de fluídica.



Figura 9. Elèctrodes connectats al potenciòmetre mitjançant la interfície.

5.2- Reactius i immunoreactius

En aquest projecte per a la formació de la SAM es va utilitzar aPEG, un alcanotiol acabat en àcid carboxílic (HS(CH₂)₁₁(EG)₆OCH₂COOH) de ProChimia Surfaces.

L'activació de la superfície de l'or es va dur a terme amb EDC hidroclorít 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) i NHS (sulfo-N-hidroxisuccinimida) de Sigma-Aldrich®. Els anticossos utilitzats en aquest treball van ser produïts en rata, en el cas de la IL-6, anticòs purificat anti-ratolí IL-6 i en el del TNF- α , anticòs purificat anti-ratolí TNF- α ambdós de BD Pharmingen™.

La interleuquina 6 recombinant de ratolí (rM-IL-6) i el factor de necrosis tumoral alfa recombinant de ratolí (rM- TNF- α) eren de Shenandoah Biotechnology Inc™.

Per últim els anticossos biotinitats eren també anti-ratolí produït en rata en ambdós casos, IL-6 i TNF- α , proporcionats per BD Pharmingen™ i l'estreptavidina-poli-peroxidasa de rave picant (SAV-poli-HRP) per ThermoFisher Scientific™, aquesta es va utilitzar com a traçador enzimàtic del immunoassaig.

5.3- Tampons i solucions

Per als rentats inicials després de l'activació de la superfície d'or es va utilitzar àcid 2-morfolinoetanosulfònic monohidratat (MES hydrate) 0.1 M a pH 5. En la incubació del anticòs primari es va utilitzar tampó fosfat salí (PBS) 10 mM a pH7 i per al posterior bloqueig tampó fosfat salí al 1% en albúmina de sèrum boví (PBST-BSA 1%) a pH 7.5.

En l'etapa de captura del Immunoassaig es va utilitzar medi de diferenciació, DM, que conté DMEM 1X (41965-039, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA) a 1% estreptomycina/penicilina i 2% en sèrum equí.

Els rentats entre etapes, la incubació del anticòs secundari i la de l'estreptavidina marcada amb poli-HRP també es realitzaven amb PBS. Per fer les mesures electroquímiques en el potenciòmetre s'utilitzava tampó citrat 0.02 M en KCl 0.1 M a pH 5.4. La solució del substrat consistia en 976 μ l de tampó citrat, 16 μ l de TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) i 8 μ l de H₂O₂ 1%.

5.4- Protocol

Protocol de treball amb SPGE (Screen printed gold electrodes) per a la detecció d'analits mitjançant anticossos específics:

DIA 1

1- Preparació dels elèctrodes: rentar l'òdria amb etanol, assecar amb gas nitrogen, activar la superfície dels elèctrodes amb el UV-O₃ Cleaner durant 15 minuts i col·locar els elèctrodes en la cel·la de PMMA.

2- Formació de la SAM: afegir 50 μ l en cada elèctrode de la solució de aPEG 5mM.

3- Protegir la cel·la amb un film, tapar amb paper d'alumini i deixar-ho tota la nit.

DIA 2

4- Rentar els elèctrodes amb etanol (2 vegades) i amb tampó MES (1 cop).

5- Activació dels elèctrodes: afegir 50 μ l en cada un de la solució 0.02 M EDC/sNHS ((1:1) i deixar durant 45 minuts.

6- Afegir 50 μ l a cada elèctrode de la solució de l'anticòs primari (anticòs de captura), incubar durant 2 hores.

7- Rentar els elèctrodes amb PBS (3 vegades).

8- Bloquejar amb 100 μ l per elèctrode de la solució de PBS – 1% BSA, deixar 1 hora.

9- Rentar els elèctrodes amb PBS (3 vegades).

10- Afegir 50 μ l a cada elèctrode de solució de l'analit (IL-6 o TNF- α) i incubar durant 1 hora.

11- Rentar els elèctrodes amb PBS (3 vegades).

12- Afegir 50 μ l a cada elèctrode de la solució de l'anticòs secundari (anticòs biotinitat), incubar durant 30 minuts.

13- Rentar els elèctrodes amb PBS (3 vegades).

14- Afegir 50 μ l a cada elèctrode de la solució del conjugat SAV-poli-HRP, incubar durant 30 minuts.

15- Rentar els elèctrodes amb PBS (3 vegades).

- 16- Afegir 50 μ l a cada elèctrode de la solució tampó citrat.
- 17- Dur a terme una detecció amperomètrica aplicant un voltatge de -0,2V durant 250 segons.
- 18- Afegir 10 μ l a cada elèctrode de substrat als 100 segons.
- 19- Obtenció de resultats del potenciòmetre i anàlisi dels mateixos.

5.5- Optimització dels immunoreactius

La part experimental va consistir en el desenvolupament i optimització d'un immunoassaig en format sandvitx (Figura 10) que, com s'ha vist en el protocol, constava de la formació i activació d'una SAM sobre la superfície de l'or, una etapa inicial de captura del biomarcador mitjançant l'ús d'un anticòs anomenat anticòs de captura, una posterior etapa de detecció via un segon anticòs marcat, en aquest cas amb biotina, i l'addició final del bioconjugat SAV-poli-HRP.

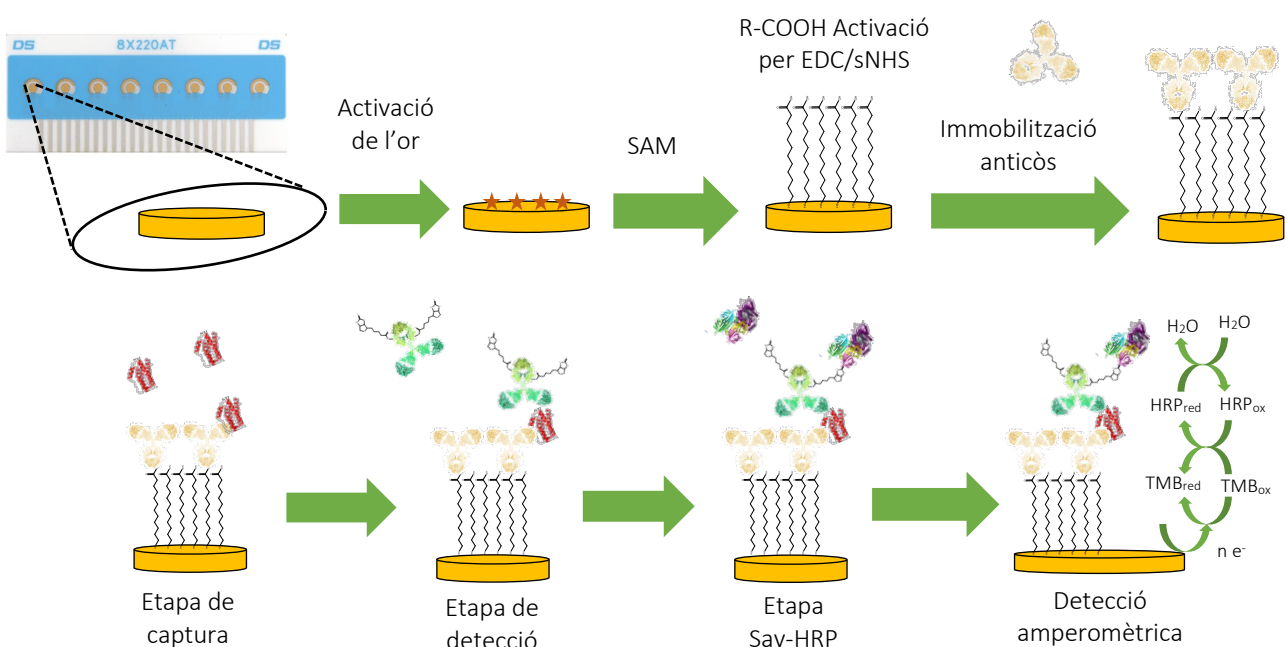


Figura 10. Esquem del procediment seguit en la part experimental descrit en el Protocol.

Prèviament al desenvolupament de les corbes de calibrat, es van optimitzar les concentracions dels diferents immunoreactius que participen a l'assaig sandvitx. Per això es van dur a terme assajos de titració on s'avaluaven diferents concentracions del reactiu en qüestió. Una vegada optimitzada aquesta concentració, es fixava i es passava a la optimització del següent reactiu, de forma seqüencial. Es van realitzar 2 experiments per cada immunoreactiu, menys per la SAV-poli-HRP en IL-6 que van ser 3.

5.5.1 Anticòs de Captura

Com s'ha vist anteriorment l'anticòs de captura era el primer immunoreactiu que s'utilitzava, aquest quedava unit covalentment a la SAM i s'encarregava de captar de manera específica la citocina.

El rang de concentracions que es va avaluar de l'anticòs de captura de IL-6 era de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$ i per al de TNF- α de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$; mantenint constant la concentració de la proteïna (IL-6 o TNF- α , respectivament) a 1 $\mu\text{g/ml}$. En aquests assajos la concentració de l'anticòs biotinilat tant per a la IL-6 com per al TNF- α era de 10 $\mu\text{g/ml}$ i la de la SAV-poli-HRP de 1 $\mu\text{g/ml}$.

5.5.2 Anticòs Biotinilat

L'anticòs biotinilat reconeixia de forma específica i a través d'altre epítop diferent al reconegut per l'anticòs de captura a la citocina capturada pel primari i s'unia a ella.

En aquest cas el rang de concentracions que es va avaluar per l'anticòs biotinilat de IL-6 era de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ i per al de TNF- α de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$. La concentració de l'anticòs de captura IL-6 era de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ i el de TNF- α de 10 $\mu\text{g/ml}$. La concentració de la proteïna en qüestió seguia sent constant a 1 $\mu\text{g/ml}$ i la de la SAV-poli-HRP també a 1 $\mu\text{g/ml}$.

5.5.3 Bioconjugat SAV-poli-HRP

Per últim, s'utilitzava el conjugat estreptavidina poliperoxidasa de rave picant com a traçador enzimàtic degut a la gran afinitat que presenta el parell biotina-estreptavidina, comparable a la d'un anticòs i el seu corresponen antigen. L'enzim peroxidasa del compost generava una reacció redox a l'entrar en contacte amb el substrat i la transferència electrònica generada en aquesta reacció es mesurava amb el potenciòmetre de Dropsens. La intensitat de corrent mesurada estava directament relacionada amb la concentració de biomarcador present a la mostra en qüestió.

El rang de concentracions del biconjugat que es va avaluar era de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$.

La concentració de l'anticòs de captura per a la IL-6 era de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ i per al TNF- α de 10 $\mu\text{g/ml}$, la de la proteïna (IL-6 /TNF- α) a 1 $\mu\text{g/ml}$ i la de l'anticòs biotinitat per a la IL-6 era de 5 $\mu\text{g/ml}$ i per al TNF- α de 40 $\mu\text{g/ml}$.

5.6- Elaboració de corbes de calibrat

Un dels paràmetres que era necessari determinar era el rang de detecció de l'immunosensor, per tal de saber a quines concentracions podia treballar aquest. Per aquest motiu i per poder definir una funció a la qual interpolar els valors obtinguts de les mostres, es va estudiar la dosi-dependència de cadascun dels immunoassajos desenvolupats mitjançant la construcció de corbes de calibrat. Aquestes corbes es basen en la correlació entre una senyal analítica i una concentració determinada d'analit. Per això en cada elèctrode de l'òbvia s'afegia una concentració de l'estàndard coneguda, de major a menor, i en l'últim, un blanc.

Com s'ha comentat en l'apartat d'hipòtesi i objectius, el que pretén aquest mètode és la integració d'un sistema capaç de detectar les molècules que es troben suspeses en fluids que circulen a través de canals per això es va treballar en condicions fluídiques. Aquestes consistien en una bomba peristàltica i un sistema de tubs connectats a la cel·la on es trobaven els elèctrodes, tal i com es pot veure en la Figura 11- Imatge esquerra. En aquest cas, igual que en els anteriors es va seguir el procediment descrit en el protocol.

També es va dur a terme assajos en format múltiplex on hi havia connectades en sèrie dues cel·les de fluídica, una per a cada biomarcador, tal i com es mostra en la figura 11 – Imatge dreta el fluid primer passava per la cel·la de IL-6 i després per la de TNF- α .

El rang de concentració tant de IL-6 i com de TNF- α en el que es va dur a terme la corba era de de 0 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$. La concentració de l'anticòs de captura per a la IL-6 era de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ i per al TNF- α de 10 $\mu\text{g/ml}$, de l'anticòs biotinitat per a la IL-6 era de 5 $\mu\text{g/ml}$ i per al TNF- α de 40 $\mu\text{g/ml}$ i de SAV-poli-HRP 1 $\mu\text{g/ml}$.

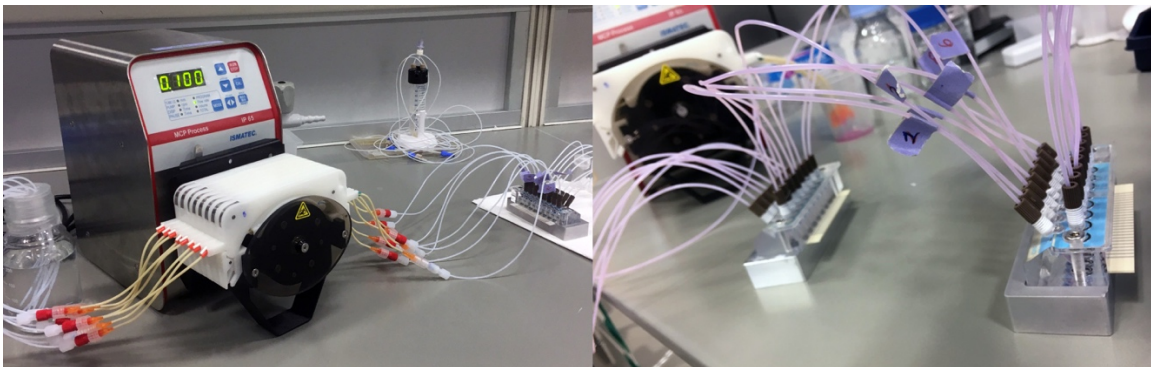


Figura 11. Imatge esquerra: Sistema de fluídica, cel·la connectada a la bomba peristàtica mitjançant tubs. Imatge dreta: Dues cel·les de fluídica connectades en sèrie.

5.7- Anàlisi de mostres del bioreactor

Per comprovar que els biosensors quedaven ben integrats amb la fluídica i funcionaven correctament, es van dur a terme experiments amb mostres procedents del bioreactor tant recollides i analitzades a posterior com amb el bioreactor connectat in situ. Les cèl·lules musculars del bioreactor estaven estimulades elèctricament per mimetitzar el teixit *in vivo*.

L'assaig consistia en estimular les cèl·lules durant una hora aproximadament i analitzar el medi en el que es trobaven, des del principi de l'experiment fins a unes 2 hores després, a diferents temps. L'objectiu era observar la quantitat de citocines que segregaven com a resposta al estímul.

En la figura 12 es pot veure com es van dur a terme els experiments in situ. El bioreactor estava connectat amb un reservori de medi, un generador de corrent i la cel·la dels immunosensors que al mateix temps estava connectada a la bomba peristàtica. De tal manera que el medi que passava per el teixit després circulava a través dels canals de fluídica fins als elèctrodes del biosensor permeten així la detecció específica de les citocines que havien alliberat les cèl·lules del teixit estimulat elèctricament.

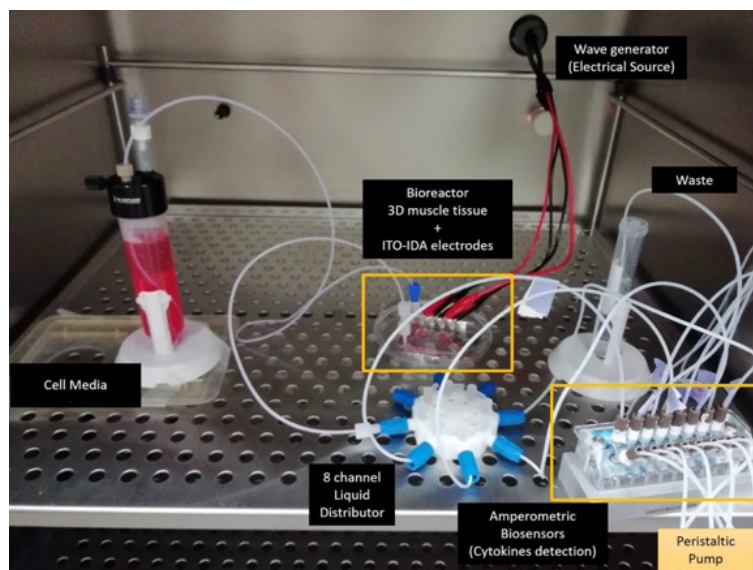


Figura 12. Muscle-on-a-chip integrat amb els biosensors.
FONT: Biosensors for Bioengineering, projecte DAMOC.

6- Resultats i discussió

- Optimització de l'anticòs de captura

Tal i com es pot apreciar en la Figura 13 (marcat en verd), les concentracions òptimes van ser 1.5 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$ per a la IL-6 i el TNF- α , respectivament. Es van definir aquests valors com a òptims per ser els punts en els quals s'arriba a la "zona plateau" de la corba i per tant, els punts de saturació per a cada un dels biomarcadors. A partir d'aquests, tot i augmentar la quantitat d'anticòs, no augmenta la senyal degut a que la superfície del elèctrode està coberta completament pels anticòssos donant així la màxima senyal possible. Si s'augmenta la concentració es poden donar interaccions entre les espècies i afectar al immunoassaig.

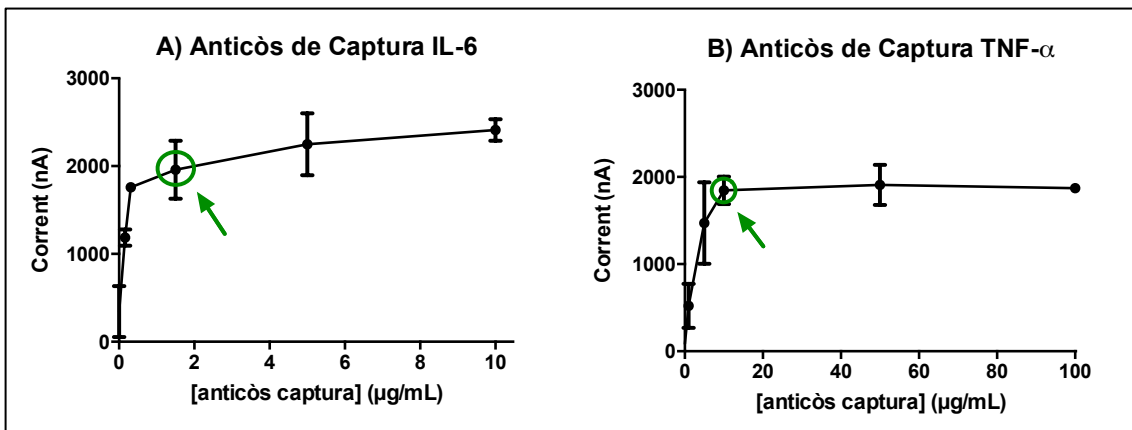


Figura 13. A) Corba de l'optimització del anticòs de captura per a IL-6. B) Corba de l'optimització de l'anticòs de captura per a TNF- α .

- Optimització de l'anticòs biotilinat

Per a aquest anticòs les concentracions optimitzades van ser 5 µg/ml per a la IL-6 i 40 µg/ml per al TNF- α com es pot veure en les Figura 14. El criteri que es va seguir és el mateix que en el cas anterior.

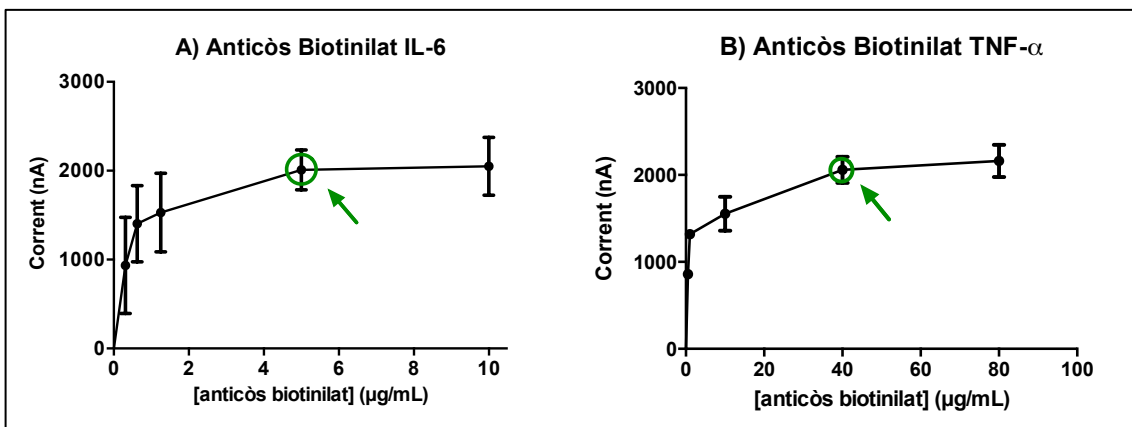


Figura 14. A) Corba de l'optimització del anticòs biotinilat per a IL-6. B) Corba de l'optimització de l'anticòs biotinilat per a TNF α .

- Optimització del conjugat SAV-poli-HRP

Tal i com es mostra en la Figura 15 per al bioconjugat la concentració més òptima de treball és 1 µg/ml per ambdues citocines. Es va decidir que fos 1 µg/ml, tot i que en la gràfica A no sigui el punt exacte de saturació, per la variabilitat dels dos punts següents i

en comparació a la TNF- α . El comportament de la estreptavidina p-HRP és similar entre ambdues citocines.

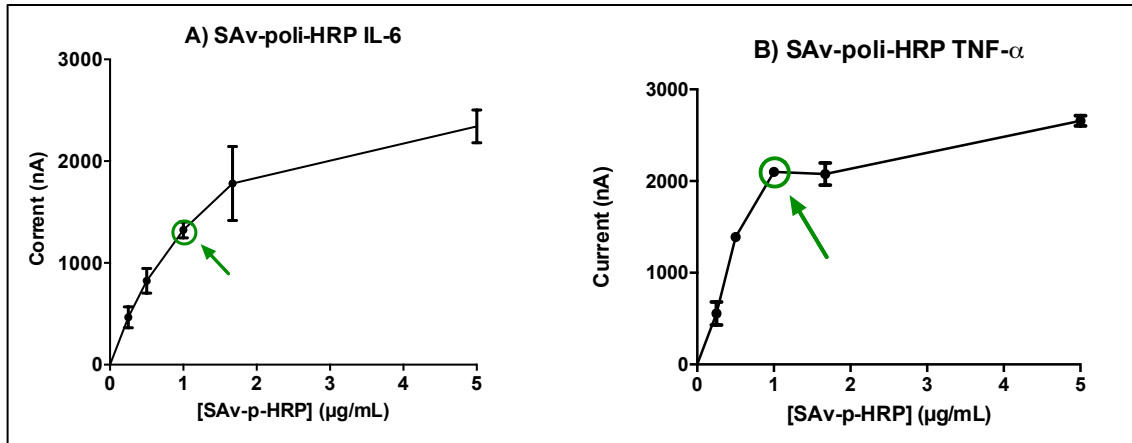


Figura 15. A) Corba de l'optimització del bioconjugat SAV-poli-HRP per a IL-6. B) Corba de l'optimització del bioconjugat SAV-poli-HRP per a TNF α .

- Corbes de calibrat (CC)

En aquest cas la representació gràfica dels resultats és una corba sigmoïdal, sent la zona lineal d'aquesta la d'interès ja que el rang de treball (WR) es troba entre el 20% i el 80% de la senyal detectable pel immunosensor. El rang de treball correspon al rang que pot ser determinat correctament pel sistema, per sota o per sobre d'aquests percentatges no és pot dir que l'assaig sigui fiable si el que es pretén és quantificar a partir de la senyal. Per altre banda, el límit de detecció (LOD) és la concentració mínima d'analit que pot ser detectada pel sensor i en aquest treball es correspon amb el 10% de la senyal detectada. Com s'ha comentat anteriorment el tractament dels resultats s'ha realitzant amb el programa GraphPad Prism 6, en aquest cas utilitzant un ajust de log(dosi) vs. resposta amb una equació sigmoïdal de quatre parametres de pendent variable. A partir d'aquest s'ha determinat el WR (20% i 80% de la senyal màxima) i el LOD (10% de la senyal màxima).

Es van dur a terme 6 assajos per a la IL-6 i 3 per al TNF- α , en la Figura 16 es pot veure com ambdues gràfiques segueixen el model sigmoïdal. La corba del TNF- α s'ajusta millor al model però utilitza la meitat d'experiments que la de IL-6, per tant, la variabilitat és menor. Com es pot veure en la taula 1, el límit de detecció dels experiments amb IL-6 va ser a 8ng/ml i en els de TNF α , a 2ng/ml.

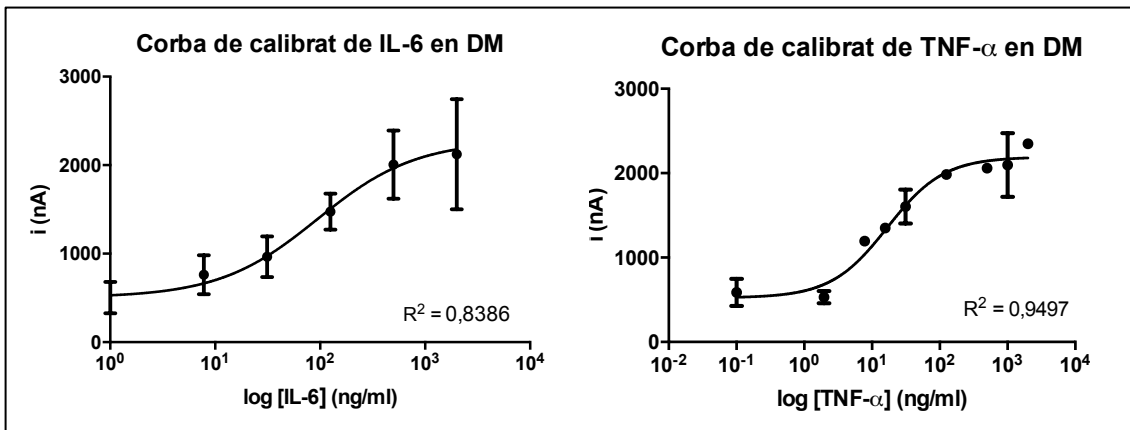


Figura 16. Esquerra: Corba de calibrat per a IL-6 en condicions fluídiques en medi de diferenciació. Dreta: Corba de calibrat per a TNF α en condicions fluídiques en DM.

	CC IL-6	CC TNF- α
LOD (ng/ml)	7,93	2,36
WR (20%) (ng/ml)	18,74	5,09
WR (80%) (ng/ml)	277,35	109,82

Taula 1. Límit de detecció i rang de treball de les corbes de calibrat de IL-6 i TNF- α

Comentar que aquests assajos, tant les corbes de calibrat com les optimitzacions, comporten molta manipulació per part de la persona que realitza l'assaig, això pot incrementar la variabilitat que s'observa en les gràfiques. Tanmateix, com es pot veure en la Taula 1 el límit de detecció dels sensors està en el rang de ng/ml, això vol dir que tenim un sistema de detecció bastant sensible.

- Anàlisi de mostres del bioreactor

Amb aquests assajos el que es pretenia era demostrar que els sensors eren capaços d'enregistrar diferents nivells de citocines enfront a un estímul extern.

Tant en el cas de la IL-6 com en el del TNF- α s'observa (Figures 17 i 18) un clar increment de la producció de citocines a partir de l'hora, justament quan es deixaven d'estimular les cèl·lules. Aquest comportament podria ser degut a una resposta inflamatòria provocada per l'estímul elèctric. També s'ha vist en la literatura que la IL-6 s'allibera després de les contraccions musculars per ajudar en la regeneració del múscul i per curar

les ruptures que es produeixen durant l'exercici, explicació que també coincideix amb els resultats. En el cas del TNF- α , els nivells de les senyals obtingudes estan al voltant del límit de quantificació (línia discontinua de la Figura 18), pel què podem dir que es segrega molt poca quantitat d'aquest però tot i així el sistema és capaç de detectar-lo.

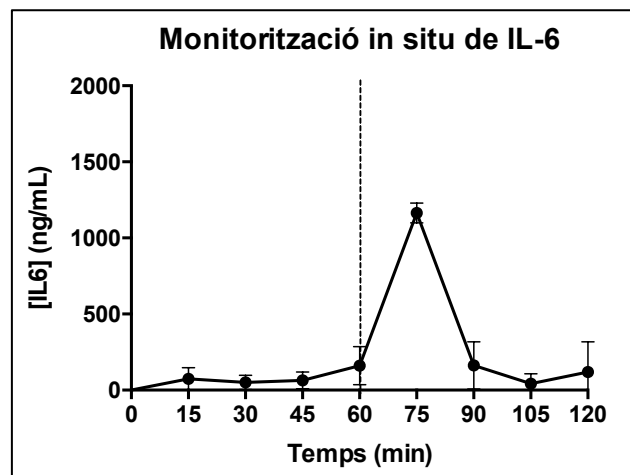


Figura 17. Representació de la concentració detectada de IL-6 versus el temps en el bioreactor in situ en medi de diferenciació.

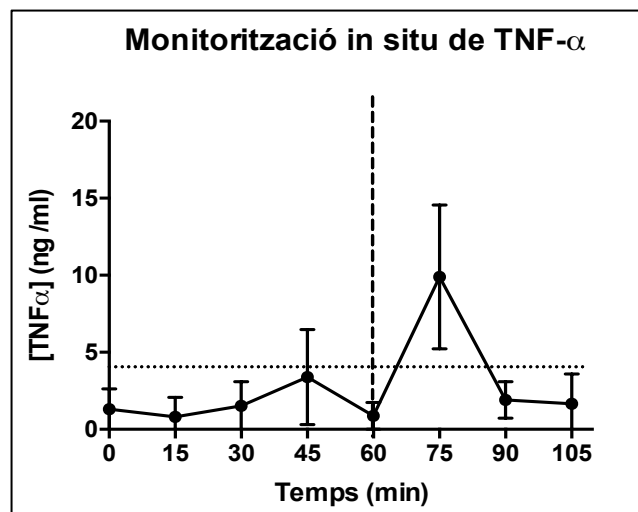


Figura 18. Representació de la concentració detectada de TNF- α versus el temps en el bioreactor in situ en medi de diferenciació.

En aquests resultats s'ha vist que hi ha una bona reproductibilitat entre experiments tot i que cadascun d'aquests és un sistema biològic diferent, el què aporta variabilitat. I destacar que s'ha utilitzat també el sistema múltiplex per la detecció simultània de les dues citocines, demostrant el seu correcte desenvolupament.

7- Conclusions

En base als objectius plantejats inicialment en aquest treball, s'ha aconseguit integrar amb èxit immunosensors SPGE en muscle-on-a-chip per a la detecció de IL-6 i TNF- α .

Les concentracions òptimes dels immunoreactius s'han fixat a 1.5 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$ per a l'anticòs de captura de IL-6 i el TNF α , respectivament. En l'anticòs biotinitat a 5 $\mu\text{g/ml}$ per a la IL-6 i 40 $\mu\text{g/ml}$ per al TNF α ; i la SAV- poli-HRP a 1 $\mu\text{g/ml}$ per ambdós.

En quant les corbes de calibrat, els límits de detecció són de l'ordre dels ng/ml per als dos biomarcadors, per tant, s'ha aconseguit desenvolupar uns immunosensors bastant sensibles. Per últim, en els experiments en el xip s'han pogut detectar diferents concentracions de citocines.

Un dels punts més rellevants d'aquest projecte ha estat incorporar la fluídica als immunosensors, ja que com s'ha comentat en la introducció, el seu ús és pràcticament imprescindible en els dispositius tipus òrgan-on-a-chip. S'ha demostrat que el sistema de detecció proposat funcionava tant per si sol com connectat al bioreactor que és el que es pretenia. Poder detectar *in situ* aquestes proteïnes segregades en el sistema muscular *in vitro* elèctricament estimulat representa una gran innovació, a més aquest sistema ha permès monitoritzar la segregació en el temps i així conèixer més en detall el procés.

També fer especial menció a l'ús d'un sistema múltiplex que a permès la detecció simultània de les dues citocines, reduint així el temps que dura l'assaig i l'error experimental degut a la manipulació de les mostres.

La variabilitat que s'ha observat en els experiments amb les mostres del teixit l'associem al sistema biològic (variabilitat entre teixits), tot i que, cada teixit va ser cultivat de la mateix manera i format sota les mateixes condicions.

La principal limitació d'aquest projecte està en que no és una detecció en temps real, la detecció és *in situ* però la lectura s'ha de fer a banda. Un altre inconvenient és que els sensors electroquímics requereixen espècies marcades per poder fer una lectura dels resultats de la detecció.

De cara a futurs projectes, *future work*, es vol explorar la detecció d'altres molècules com per exemple la insulina amb aquests immunosensors, ja què com s'ha explicat en la introducció aquesta té un paper crucial en la diabetis de tipus 2.

Actualment s'està treballant en caracteritzar els teixits per tal de disminuir la variabilitat que causen i també s'estan valorant altres tipus de sensors que permetin una detecció a temps real de les proteïnes mencionades en aquest treball, una opció són els sensors òptics.

Aquest treball només ha estat una petita part d'una gran investigació, però ha estat molt gratificant haver contribuït, en la mesura del possible. Amb l'esforç i dedicació de totes les persones que hi treballen s'aconseguirà que el què a dia d'avui és un projecte es converteixi en una realitat.

8- Bibliografia

Jivani, R. R., Lakhtaria, G. J., Patadiya, D. D., Patel, L. D., Jivani, N. P., & Jhala, B. P. (2016). Biomedical microelectromechanical systems (BioMEMS): Revolution in drug delivery and analytical techniques. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.003>

Maheshwari, N., Chatterjee, G., & Rao, V. R. (2014). A Technology Overview and Applications of Bio-MEMS. *Journal of Isss*, 3(september), 39–59. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i3.12.16446>

Magjarevic, R., & Diaz, M. L. Z. (2014). Biomedical engineering education - Status and perspectives. 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2014, 5149–5152. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2014.6944784>

Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology*, 32(8), 760–772. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>

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>

Kimura, H., Sakai, Y., & Fujii, T. (2018). Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.003>

Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L., & Radisic, M. (2018). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, 3(8), 257–278. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0034-7>

Ronaldson-Bouchard, K., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell*, 22(3), 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>

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>

Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 08(01), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>

Chen, S., & Shamsi, M. H. (2017). Biosensors-on-chip: A topical review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 27(8). <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aa7117>

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>

Holdsworth, S. R., & Can, P. Y. (2015). Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(12), 2243–2254. <https://doi.org/10.2215/CJN.07590714>

Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, 6(Kishimoto 1989). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>

Bustamante, M., Fernandez-Verdejo, R., Jaimovich, E., & Buvinic, S. (2014). Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca²⁺ signals and an IL-6 autocrine loop. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 306(8), E869–E882. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00450.2013>

Arya, S. K., & Estrela, P. (2017). Electrochemical immunosensor for tumor necrosis factor-alpha detection in undiluted serum. *Methods*, 116, 125–131.

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.001>

Yagati, A. K., Lee, M. H., & Min, J. (2018). Electrochemical immunosensor for highly sensitive and quantitative detection of tumor necrosis factor- α in human serum. *Bioelectrochemistry*, 122, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.03.007>

Agrawal, G., Aung, A., & Varghese, S. (2017). Skeletal muscle-on-a-chip: An in vitro model to evaluate tissue formation and injury. *Lab on a Chip*, 17(20), 3447–3461. <https://doi.org/10.1039/c7lc00512a>

WEBGRAFIA

Parc Científic de Barcelona (PCB). <http://www.pcb.ub.edu/porta/ca> [Consulta: 6 octubre 2018]

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). <http://www.ibecbarcelona.eu/ca/> [Consulta: 13 octubre 2018]

Biosensor for Bioengineering. <http://www.ibebarcelona.eu/biosensors> [Consulta: 13 octubre 2018]

DropSens. <http://www.dropsens.com> [Consulta: 6 novembre 2018]

IBEC DIVULGA. <http://divulga.ibebarcelona.eu/di-biotecnologo/> [Consulta: 6 novembre 2018]

National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering.
<https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa> [Consulta: 13 novembre 2018]

Wyss Institute. <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>
[Consulta: 9 desembre 2018]

Nature Research. <https://www.nature.com/subjects/biosensors> [Consulta: 12 desembre 2018]

9- Autoavaluació

Treballar en l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) ha estat una experiència molt enriquidora que m'ha servit per créixer tant a nivell professional com personal.

He pogut aplicar coneixements apresos a la Universitat i adquirir-ne molts de nous, sobretot en camps que no havia pogut aprofundir durant la carrera, com els immunoassaigs i els biosensors.

Personalment, ha estat un autèntic plaer treballar en el desenvolupament d'aquests immunosensors i poder veure des de dins el funcionament d'un laboratori d'investigació en una institució com és l'IBEC.

Tot i ser un petit projecte, m'ha permès adquirir experiència i millorar la capacitat crítica a l'hora d'interpretar i tractar les dades. És molt gratificant saber que els resultats que he obtingut han estat útils per a l'equip i això em fa estar satisfeta d'haver dut a terme aquestes pràctiques.

La realització d'aquest treball de fi de grau no només m'ha permès aprendre a nivell acadèmic, sinó que m'ha donat la perspectiva necessària per entendre com és realment el món laboral en l'àmbit científic i per tant, ampliar la meva formació com a biotecnòloga.

10-Annexos

Annex I – Especificacions dels SPGE de Dropsens



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 **μ Stat 8000/P Multi Potentiostat/Galvanostat**.

Related products



Full Catalogue



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

Contact Form



© DropSens, S.L. | 1.0

Annex II – Especificacions del potenciòmetre de Dropsens



DROPSSENS

Ref. STAT8000P



Following the format of our multipotentiostats with a size of only 22x20x7 cm, this equipment includes **8 channels** that can act at the same time as **8 independent potentiostats**; it also includes **one multichannel** that can act as a potentiostat where up to 8 working electrodes share an auxiliary and a reference electrode.

With ***μStat 8000P*** users can perform up to **8 different electrochemical techniques at the same time**; or carry out the **study of one technique's parameter** in just one step by applying the same electrochemical technique in several channels but selecting different values for the parameter under study. These are just examples of the enormous capabilities that our new instrument offers.

μStat 8000P can be applied for **Voltammetric** or **Amperometric** measurements, including **12 electroanalytical techniques**. In addition, ***μStat 8000P*** owners can later upgrade their instrument to a ***μStat 8000*** by just purchasing an extension. This self-upgrade does not require any hardware modification, but it is implemented by means of a **Galvanostat software update kit**.

This equipment is **Li-ion Battery powered** (DC charger adaptor also compatible), and can be easily connected to a PC via USB or **Bluetooth®**.

μStat 8000P is controlled by the powerful software **"DropView 8400"** which allows plotting of the measurements and performing the analysis of results. DropView software provides powerful functions such as experimental control, graphs or file handling, among others.

Available techniques:

POTENTIOSTAT

Voltammetry

- LSV** Linear Sweep Voltammetry
- CV** Cyclic Voltammetry
- SWV** Square Wave Voltammetry
- DPV** Differential Pulse Voltammetry
- NPV** Normal Pulse Voltammetry
- NDPV** Differential Normal Pulse Voltammetry
- ACV** AC Voltammetry

Amperometry

- AD** Amperometric Detection
- ZRA** Zero Resistance Amperometry
- FA** Fast Amperometry ($t_{int} < 0.1$ s)
- PAD** Pulsed Amperometric Detection
- COUL** Coulometric Detection



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

© Dropsens, S.L. 11/12



μ Stat 8000P Multi Potentiostat

Ref. STAT8000P

Instrument Specifications	
Power	Li-ion Battery (6150 mAh) USB DC charger adaptor compatible (5 V, 15 W)
PC interface	Bluetooth® USB
Operating modes	8x 1 Channel Potentiostat 1x 8 Channel Potentiostat
DC-Potential range	± 4 V
Current ranges (potentiostat)	± 1 nA to ± 100 mA (9 ranges)
Maximum measurable current	± 80 mA
Applied Potential Resolution	1 mV
Measured Current Resolution	0.025 % of current range (1 pA on lowest current range)
Potential Accuracy	± 0.2 %
Current Accuracy	≤ 0.5 % of current range at 100 nA to 1 mA ≤ 1 % of current range at 10 mA to 100 mA
External inputs/outputs	- 5 Digital Input/Output pins [PIO 1, PIO 2, PIO 3, PIO 4, PIO 5] - 3 Analog Inputs multiplexing PIO 1, PIO 2, PIO 3 - 2 Analog Outputs (configurable I-out or E-out) LCD display in front panel
Indicators	LCD display in front panel
Dimensions	22.2 cm x 20.5 cm x 7.5 cm (L x W x H)
Weight	1.6 kg

Control Specifications			
General Pretreatment	Conditioning stage duration:	0 – 1300 s	
	Deposition stage duration:	0 – 1300 s	
	Equilibration stage duration:	0 – 1300 s	
General Parameters	Begin, End, Base, Vertex potentials:	-4 V to +4 V	
	Step potential:	1 mV to 500 mV	
	Pulse potential:	1 mV to 250 mV	
	Scan rate:	1 ms up to 1.3 s per step	
Specific Parameters	SWV	Frequency:	1 Hz to 400 Hz
		Amplitude:	1 mV to 250 mV
	DPV, NPV, NDP	Modulation time:	1 ms to 1300 ms
		Pulse time:	1 ms to 1300 ms
	ACV	Frequency:	2 Hz to 250 Hz
		Amplitude:	5 mV to 250 mV (RMS)
	Chrono. Methods (AD, ZRA, COUL)	Interval time:	0.1 s to 1300 s
		Run time:	Hours (65000 points)
	Fast Chrono. Methods (FA)	Interval time:	1 ms to 1300 ms
		Run time:	Hours (65000 points)
PAD	Pulse time:	1 ms to 1300 ms	
	Interval time:	10 ms to 1300 ms	
	Run time:	Hours (65000 points)	

Specifications are subject to change without previous notice

Related products



CABSTAT1



CABSTATMULTI



CAST



CAST8X



8X110

Full Catalogue



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

Contact Form



© Dropsens, S.L. | 130

Annex III – Especificacions dels connectors de Dropsens






μ Stat Cable Connectors for Screen-Printed Electrodes

Refs. CAST	CAST8X
BICAST	CAST1X8
CASTLFCL	

DropSens offers connectors that act as an interface between our Screen-Printed Electrodes and *DropSens* potentiostats. They are flexible cables 1 m long.

μ Stat Cable Connector for Screen-Printed Electrodes
 Ref. CAST

Connects single (1 WE) SPEs to μ Stat 200, μ Stat 300, μ Stat 400, μ Stat 4000/P, μ Stat 8000/P, STATECL and SPELEC equipment. Recommended when using DropSens SPEs in conjunction with our Flow-Cells and Cells, or by dipping the SPEs in solution.



μ Stat Cable Connector for Dual Screen-Printed Electrodes
 Ref. BICAST

Connects dual (2 WE) SPEs to μ Stat 200, μ Stat 300 and μ Stat 400. Recommended when using DropSens SPEs in conjunction with our Flow-Cells and Cells, or by dipping the SPEs in solution.



μ Stat Cable Connector for TLFCL format Screen-Printed Electrodes
 Ref. CASTLFCL

Connects TLFCL format SPEs to μ Stat 200, μ Stat 300, μ Stat 400, μ Stat 4000/P, μ Stat 8000/P and SPELEC equipment.



μ Stat 8000/P Cable Connector for format 8X Screen-Printed Electrodes
 Ref. CAST8X

Connects 8X format SPEs (array of 8 electrochemical cells) to μ Stat 8000/P.



μ Stat 8000/P Cable Connector for individual Screen-Printed Electrodes
 Ref. CAST1X8

Connects up to 8 single (1 WE) SPEs to μ Stat 8000/P.



Related products


STAT200


STAT400


STAT8000


110


C1110


8X110

Full Catalogue





Contact Form



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

© DropSens, S.L. | 110


Annex IV – Especificacions de la cel·la de fluídica de Dropsens

DROPSENS

CSQ MED ISO 13485 CSQ ISO 9001:2008

Flow-Cell for 8X format Screen-Printed Electrodes

Ref. FLWCL8X








DropSens Flow-Cell for 8X format Screen-Printed Electrodes (Ref. FLWCL8X) is a methacrylate wall-jet Flow-Cell for Flow Injection Analysis (FIA). The bottom part of the Flow-Cell is manufactured in aluminium. The open-close system of the cell consists on two screws that facilitate the sealing of the cell and the easy sensors replacement.

This Flow-Cell is designed to obtain an inlet flow perpendicular to the working electrode's surface.

Due to the transparency of the material, the possible presence of bubbles is easily detectable. It can be used with all 8X format DropSens Screen-Printed Electrodes. 8 o-rings delimit the volume of the 8 independent electrochemical cells.

Also, a **specific connector** (ref. CAST8X) and our compatible **μ STAT 8000 Multi Potentiostat / Galvanostat** are available at [DropSens](#).

Related products

 8X110	 8X220AT	 8X550	 CAST8X	 STAT8000
--	--	--	--	---

Full Catalogue



Contact Form



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

© DropSens, S.L. | 1.0

Annex V – Fitxa de seguiment del tutor

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Jordina Balaguer Trias

Nom i Cognoms del Tutor/a: Lluís Masip Vernis

Data de la entrevista amb l'alumne: 19-10-2018

Recomanacions durant el seguiment:

- Discussió sobre els continguts i l'extensió del treball de fi de grau.
- Discussió sobre la planificació i terminis per les diferents parts del treball de fi de grau.
- Discussió sobre l'estructura específica de la memòria i la forma de presentar el treball.
- Discussió específica sobre la memòria i els resultats obtinguts.

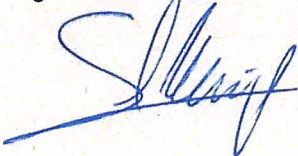
Observacions:

- El tutor considera que la memòria del treball realitzat tindrà l'extensió i continguts adients per un treball de fi de grau.
- L'alumne sempre ha tingut una actitud adequada i ha complert els terminis que havíem establert.

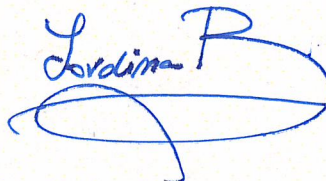
Observacions Darrera revisió:

- Diversos comentaris sobre l'última versió de la memòria (continguts, estructura, format, resultats, etc...).

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 20 de desembre 2018