

## Informe Final Justificativo

*Fecha de presentación del informe: 04/03/2020*

### DATOS DEL PROYECTO

**TÍTULO:** FABRICACIÓN DE UN DISPOSITIVO COMBINANDO MÚSCULO ESQUELÉTICO Y MICROFABRICACIÓN PARA OBTENER UN “MÚSCULO EN UN CHIP”

### COORDINADOR

Dr. Javier Ramon; *Biosensors for Bioengineering group (BfB)*, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona.

### INVESTIGADORES

Dr. Francesco de Chiara; *Biosensors for Bioengineering group (BfB)*, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona.

Dr. Juanma Fernandez Costa; *Biosensors for Bioengineering group (BfB)*, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona.

Xiomara Gislen Fernandez Garibay, *Biosensors for Bioengineering group (BfB)*, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona.

### COLABORADORES EXTERNOS:

#### CIENTÍFICOS

Dr. Ruben Artero; *Translational Genomics Group*, INCLIVA Instituto de Investigación Sanitaria, Valencia.

Dra. Gisela Nogales, *Neuromuscular and Neuropaediatric Research*, IGTP Germans Tries i Pujol Research Institute

Dr. Eduard Gallardo, *Neuromuscular BCN*, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

#### CLÍNICOS

Dra. Maria Isabel Illa, *Neuromuscular BCN*, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

#### ASOCIACIONES DE PACIENTES

Fundación Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER).

Federación Española de Enfermedades Neuromusculares (ASEM).

## RESUMEN

---

La investigación preclínica para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas está basada en gran medida en modelos animales y cultivos celulares (2D). La capacidad de extrapolar datos de estos modelos es limitada y la búsqueda de nuevos medicamentos no se puede llevar a cabo de forma eficiente. La **integración tecnológica a microescala de la ingeniería tejidos, con microfluídica, microfabricación y con biosensores** nos permitiría fabricar una **nueva plataforma** para estudiar tanto los procesos patológicos en tejido humano como para validar terapias potenciales. En este proyecto, **fabricaremos un dispositivo combinando músculo esquelético y microfabricación para obtener un “músculo en Chip”**, que nos permita un estudio más personalizado de **la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y la validación de nuevos fármacos y tratamientos**. Esta nueva plataforma lleva incorporados biosensores capaces de medir proteínas relacionadas con el metabolismo de las células musculares lo que resulta muy relevante para estudiar diferencias entre tejidos musculares de pacientes e individuos sanos y el efecto de fármacos sobre los tejidos.

## PALABRAS CLAVE

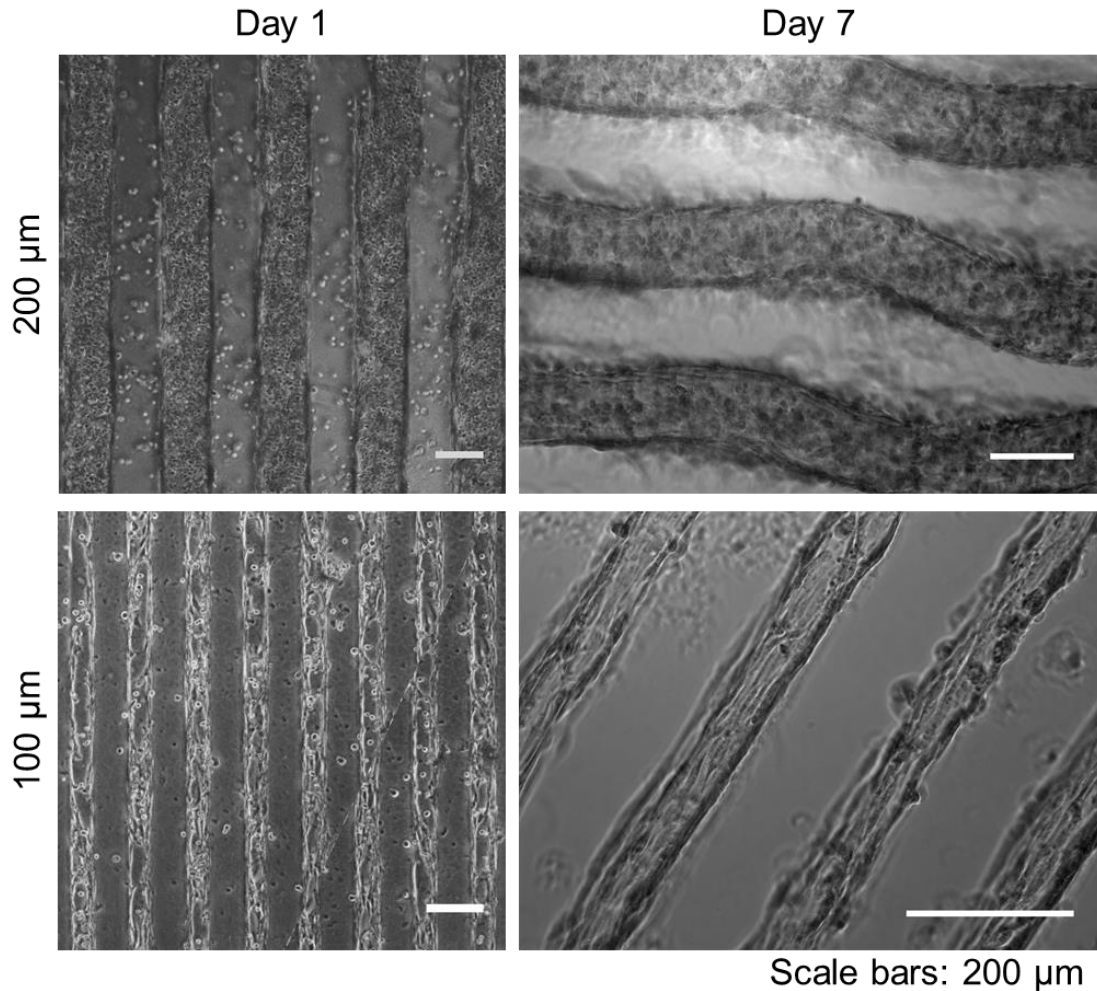
---

*Distrofia muscular, ingeniería tisular, biosensores, microfabricación, músculo esquelético, microfluídica*

## PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

### **PAQUETE DE TRABAJO 1: Investigación sobre tejidos musculares esqueléticos funcionales utilizando células progenitoras endógenas humanas y nuevos biomateriales como andamios**

#### Tarea 1.1. Formulación de compuestos de biomateriales



**Figura 1.** Células humanas encapsuladas en los andamios de GelMA y microcelulosa. Las células encapsuladas se alinean a lo largo de la estructura 3D del material formando miotubos.

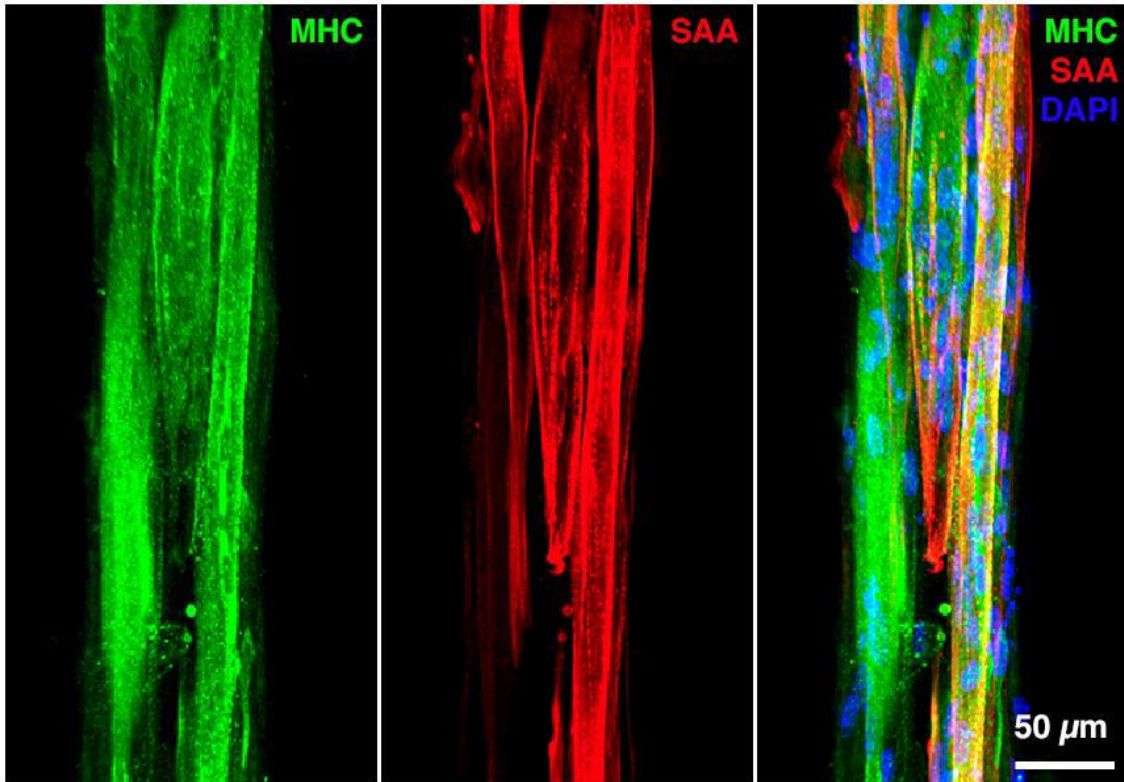
Los andamios son la parte clave en el desarrollo de tejidos de ingeniería. Apoyan el crecimiento y la diferenciación de las células progenitoras y proporcionan entornos 3D a las células. Hemos desarrollado biomateriales híbridos con propiedades mecánicas y eléctricas ajustables que dan estructura y soporte a las células, y son totalmente biocompatibles. En este proyecto, la arquitectura 3D se obtiene por fotopolimerización UV de hidrogeles metacrilados de gelatina (GelMA) en combinación con materiales de celulosa. Luego hemos usado estas estructuras como andamios para controlar la alineación celular y la organización del tejido muscular (**Figura 1**).

Para recrear una microarquitectura mimética 3D del tejido muscular esquelético nativo, se emplearon hidrogeles basados en GelMA fotopolimerizados. Dado que los hidrogeles basados en GelMA pueden degradarse por el metabolismo celular que afecta a las

propiedades fisicoquímicas espaciales, se agregó carboximetilcelulosa no biodegradable (CMC). Para hacer la CMC fotopolimerizable, se sintetizó carboxi metil celulosa metacrilada (CMCMA) y se incorporó en las soluciones de prepolímero para obtener hidrogeles compuestos. De acuerdo con el tiempo de exposición, los hidrogeles GelMA y GelMA-CMCMA condujeron a un aumento exponencial en el módulo elástico de 0.2 a 1.6 kPa, y de 0.3 a 3.9 kPa y una disminución en la proporción de hinchamiento. La adición de CMCMA mejoró la rigidez de los hidrogeles. En contraste, la presencia de CMCMA condujo a un aumento de  $1.9 \pm 0.7$  veces en la proporción de hinchamiento. La tasa de degradación enzimática está correlacionada negativamente con el tiempo de exposición a la luz UV, y la presencia de CMCMA en los hidrogeles resultó en una disminución de la tasa de degradación en comparación con los hidrogeles sin CMCMA. Debido a sus propiedades físicas como la rigidez, la hinchazón y la degradación, se eligió GelMA-CMCMA para la siguiente fase del estudio.

Para la fabricación de construcciones de músculo esquelético en 3D, se empleó una técnica de modelado de foto-molde. Se utilizó una gama de dosis de energía cambiando el tiempo de exposición a los rayos UV (de 18 a 120 s). Con 18 s de exposición a la luz UV, se obtuvieron hidrogeles más suaves y, el patrón mostró menos estabilidad y tendió a deformarse y pierde su forma, mientras que, a tiempos de exposición más largos, dio lugar a hidrogeles más rígidos y el patrón se mantuvo estable a lo largo del tiempo de cultivo. Las células se dejaron en medio completo durante 56 días para permitirles adaptarse a las nuevas configuraciones y estimular la propagación de las células, y luego el medio de crecimiento (10% FBS) se reemplazó con medio de diferenciación (2% FBS) para promover la diferenciación de los miotubos. El tejido muscular se caracteriza por la presencia de miotubos muy alineados y largos, y el hidrogel que contiene las células debe permitir el crecimiento celular, el alargamiento y la fusión, para imitar el tejido muscular nativo. En los hidrogeles reticulados durante 24 s, las células mostraron el mayor alargamiento determinado por la relación de aspecto y la circularidad celular, en comparación con los otros puntos de tiempo. Los hidrogeles fabricados por más de 60 s de tiempo de exposición contenían células que alcanzaron la relación de aspecto más baja y la circularidad más alta, sin diferencias significativas. El ensayo vivo / muerto dentro de los hidrogeles mostró una disminución del 20% de la viabilidad celular en 60 s de exposición a UV en comparación con 24 s, en el día 1. Esta diferencia se hizo menos prominente en los días 6 y 10. Esta condición representó un buen compromiso entre la estabilidad del hidrogel y la forma y el comportamiento de las células, y se eligió un tiempo de exposición óptimo.





**Figura 2.** Cultivo muscular en 3D de células derivadas de pacientes con DM1. 15 días después de la encapsulación en el hidrogel, los fibroblastos transdiferenciados forman miotubos. Las imágenes confocales muestran los miotubos teñidos para detectar la cadena pesada de miosina (MHC) marcada en verde, la alfa-actinina sarcomérica (SAA) en rojo y los núcleos en azul.

Para desarrollar tejido muscular DM1 in vitro, hemos utilizado el modelo de células bien definido por Arandel et al. [1]. En resumen, estos son fibroblastos de piel derivados de pacientes (1300 repeticiones de CTG) que fueron inmortalizados por la reexpresión de hTERT. Estas células se transdujeron posteriormente con un vector lentiviral que contenía un constructo MyoD de Tet-on (doxiciclina) inducible, de modo que la expresión de MyoD provoca la transdiferenciación de los fibroblastos a mioblastos y más tarde a los miotubos. Hemos encapsulado estas células en hidrogeles GelMA y hemos obtenido miotubos DM1 después de 15 días de cultivo 3D con medio suplementado con doxiciclina para inducir la expresión de MyoD (**Figura 2**). También hemos optimizado las condiciones de cultivo, es decir, número de células encapsuladas, tiempo de diferenciación, dosis de estimulación eléctrica, para obtener tejido muscular DM1 a partir de cultivos celulares en los microdispositivos 3D. La estimulación eléctrica y la alineación de las células encapsuladas dentro del biomaterial, favorece la diferenciación muscular a las miofibras. El proceso se caracteriza observando la alineación y la fusión de las células bajo microscopía de contraste de fase. Para confirmar la correcta diferenciación de los cultivos celulares, se ha realizado una tinción inmunohistoquímica para la cadena pesada de miosina (MHC) y alfa-actinina sarcomérica (SAA). Hemos llevado a cabo este proceso tanto con células de pacientes con DM1 como con células derivadas de controles sanos (también disponibles en [1]). Aunque nuestros resultados preliminares apuntan a la viabilidad de obtener músculos 3D de mioblastos transdiferenciados, también estamos utilizando mioblastos inmortalizados de pacientes y control, con mioblastos humanos comerciales (Promocell) y del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Dr. Maria Isabel Illa). Finalmente, una vez que ya tenemos establecido el cultivo en 3D del músculo, estamos empezando a trabajar con mioblastos provenientes

de biopsias del Instituto de Investigación Trias i Pujol (IGTP). La Dra. Gisela Nogales-Gadea del IGTP ha establecido y caracterizado 16 líneas de mioblastos primarios (8 sanos y 8 DM1) de personas con diferente género, edad y grado de enfermedad. Estas células se han caracterizado bien a niveles de fenotipo molecular y celular DM1. Utilizaremos estas células para generar músculo integrado en nuestra plataforma con dos propósitos. Primero, para demostrar que los resultados que obtenemos se deben a mutaciones DM1 y segundo para analizar la variabilidad fenotípica del músculo fabricado mediante ingeniería de tejidos con una perspectiva de género y edad.

Para caracterizar los tejidos musculares diferenciados *in vitro*, hemos obtenido una serie de parámetros histológicos y moleculares típicos de la enfermedad. El índice de fusión (porcentaje de núcleos que se han fusionado en miotubos) del músculo DM1 y el diámetro de los miotubos se reduce en comparación con los controles. Estos parámetros se han obtenido mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-MHC y anti-SAA que marca el músculo diferenciado terminalmente. El secuestro de MBNL1 en los focos ribonucleares se determinará mediante la inmunodetección de la proteína con anticuerpos anti-MBNL1 disponibles en el mercado y la detección simultánea del ARN CUG por FISH.

La microscopía de campo brillante reveló una distribución homogénea de las células en el día 0 (24 h después de la siembra). En el día 6, el medio de crecimiento (FBS al 10%) se reemplazó con el medio de diferenciación (FBS al 2%), donde la progresión celular y el alargamiento hacia la formación de miotubos es visible desde el día 10 en adelante. Aquí, el control preciso de la organización celular en 3D proporcionado por microestructuras promueve altamente la diferenciación y maduración miogénica celular. La alineación de las células y la forma y la formación se evaluaron mediante la tinción con F-actina. Dentro de los hidrogeles en forma de disco, sin patrón, las células y los miotubos se alinearon al azar, mientras que, en los hidrogeles con patrón, el 90% de las células y los miotubos siguen la dirección del patrón (**Figuras 1 y 2**). Además, los hidrogeles con micro patrón mejoraron la fusión celular y la maduración de miotubos en comparación con las células en hidrogeles sin patrón evaluados mediante tinción con MHC. En este caso, el control preciso de la organización celular en 3D proporcionado por microestructuras promueve en gran medida la diferenciación y maduración miogénica celular. Este ensayo demostró que se produjo un alargamiento y alineamiento celular significativos en el día 15 a lo largo de todo el espesor de las micro-construcciones con patrón en comparación con la amplia distribución de miotubos observada en el grupo control. Además, los microprocesadores restringieron el grado de alineación celular entre  $0^\circ$  y  $15^\circ$ , mientras que las células sin patrón se distribuyeron aleatoriamente de  $0^\circ$  -  $90^\circ$ .

Finalmente, como trabajo futuro para la tarea 1.1, queremos seguir caracterizando los tejidos musculares obtenidos, estudiando la *spliceopathy* en los nuevos tejidos musculares, analizaremos varios eventos de corte y empalme de DM1 mediante RT-PCR semicuantitativa (es decir, ATP2A2, BIN1, DMD, IR, CIC-1, entre otros). Por otra parte, la regulación al alza de CELF1 en los nuevos tejidos musculares DM1 también se estudiará mediante transferencia de Western. Además, analizaremos la expresión de los genes implicados en la atrofia muscular y la autofagia (es decir, FOXO1, FOXO3, MURF1, FBXO32 e IL-1 $\beta$ ) que recientemente hemos demostrado que están desregulados en las muestras de DM1. Todos los ensayos se realizarán en paralelo en DM1 y los

músculos de control y las diferencias se determinarán mediante la prueba t de Student. La caracterización completa se basará en el uso de 8 líneas de DM1 independientes de la Dra. Gisela Nogales-Gadea (IGTP) y 8 líneas sanas además de las 2 líneas de Arandel et al. Por lo tanto, en todos nuestros ensayos, analizaremos tejidos musculares DM1 de bioingeniería de pacientes independientes y controles sanos independientes. Estos controles independientes son clave para demostrar que los resultados que obtenemos se deben a la mutación de DM1. En caso de que todos los análisis anteriores confirmaran la existencia de defectos moleculares similares a DM1 reproducibles en el nuevo modelo de músculo DM1 con bioingeniería, realizaremos una descripción global del transcriptoma de DM1 diferenciado in vitro y el músculo de control. Para ello, se extraerá el ARN total.

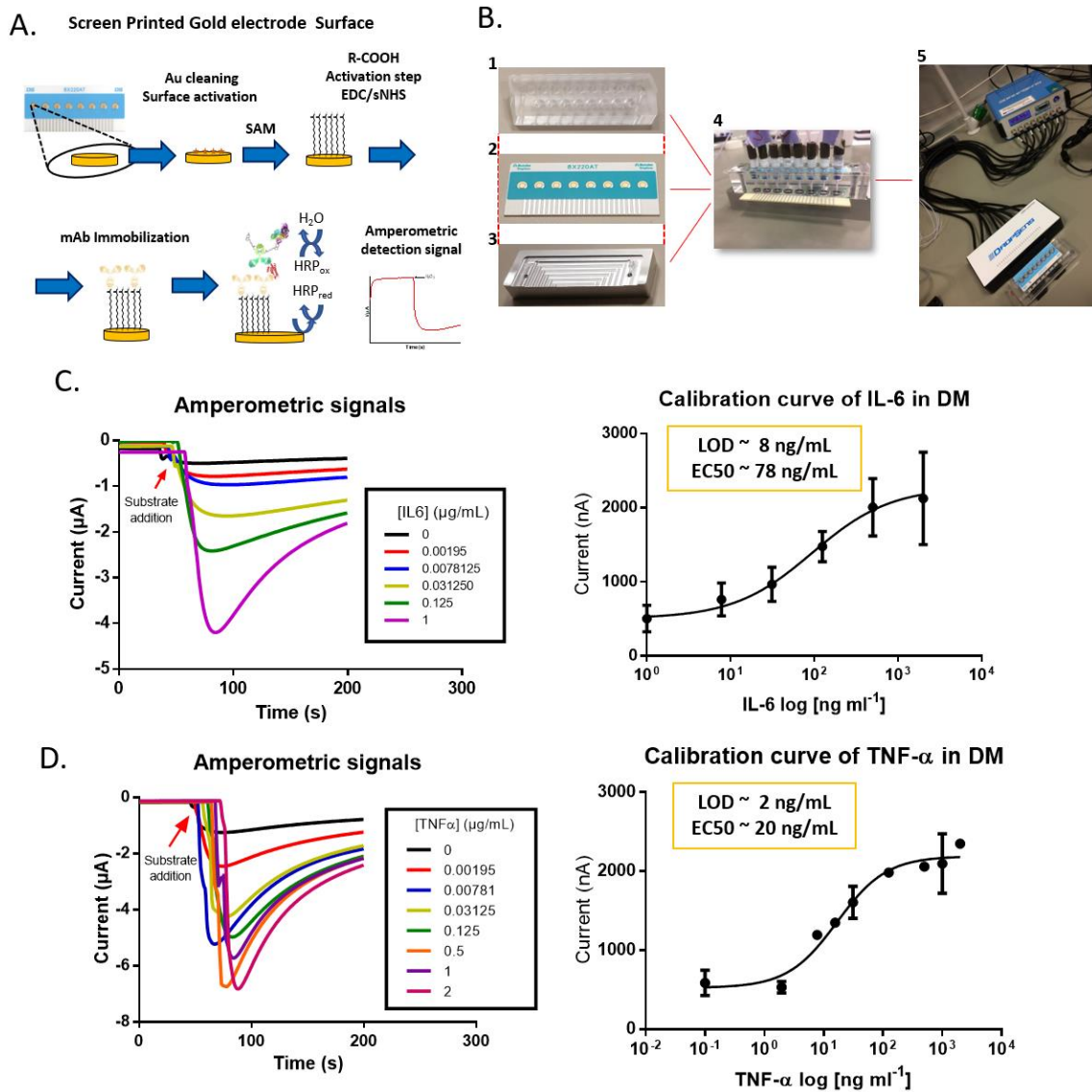
1. Arandel, L., et al., Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Dis Model Mech*, 2017. 10(4): p. 487-497.

## **PAQUETE DE TRABAJO 2: Desarrollo de tecnologías de biosensores para detectar respuestas celulares a estímulos externos y monitorear la calidad del microambiente tisular**

### Tarea 2.1 Desarrollo de tecnologías de biosensores para detectar respuestas celulares a estímulos externos y monitorear la calidad del microambiente tisular

Los electrodos de oro serigrafados (SPGE) comerciales fueron elegidos como superficie para anclar los anticuerpos IL-6 y TNF- $\alpha$  para la detección de biomarcadores secretados por las células en chip. Primero, el sensor de oro se activó usando UV / Ozone Procleaner<sup>TM</sup> durante 15min. La capacidad de unión óptima de la superficie se obtuvo con el ácido (20-11-mercaptoundecanoil) -3,6,9,12,18-hexaoxaecosanoico que contiene un grupo tiol, (11) cadena de carbono, 3 unidades de etilenglicol y un carboxílico Grupo terminal (-COOH) (ácido SH-PEG) como se demostró mediante voltamogramas cíclicos con y sin ácido SH-PEG. Esta monocapa (SAM) se activa mediante la reacción de EDC / NHS seguida de la inmovilización de los anticuerpos primarios de IL-6 y TNF- $\alpha$ . La detección del medio celular se realizó utilizando un método de inmunoensayo de tipo sándwich con anticuerpos primarios biotinilados que a su vez se detecta mediante el complejo de estreptavidina-HRP. La reacción de TMB catalizada por HRP se registró mediante una señal amperométrica. La cámara de detección de células secretas (CSDC) está constituida por 5 partes: 1) cubierta celular microfluídica de PMMA; 2) electrodo funcionalizado SPGE; 3) Caja de soporte de electrodos de acero inoxidable; 4) Cámara de detección de células acoplada con conectores microfluídicos; 5) Potenciostato. Luego, el módulo se conecta al microdispositivo (**Figura 3**). Los anticuerpos comerciales IL-6 y TNF- $\alpha$  se validaron mediante ELISA, límite de detección (LOD) 0.031 (SD) ng / mL con una pendiente de  $0.726 \pm 0.008$  y LOD 0.038 (SD) ng / mL con una pendiente de  $0.498 \pm 0.012$ , respectivamente. El efecto de los parámetros experimentales se investigó uno por uno y se aplicaron condiciones optimizadas a los experimentos posteriores. Ambos anticuerpos empleados en este estudio mostraron una alta afinidad por el SAM funcionalizado. Las concentraciones óptimas de anticuerpos primarios elegidas para los siguientes experimentos fueron 1.5 y 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para IL-6 y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Las concentraciones óptimas de anticuerpos biotinilados secundarios fueron 5 y 40  $\mu\text{g} /$

ml para IL-6 y TNF- $\alpha$ , respectivamente (**Figura 3**). En la Figura 3, se muestra la cinética de conexión del SAV-polyHRP al secundario. El tiempo requerido para la oxidación de TMB catalizada por HRP se fijó en 160 segundos. La interpolación de señales amperométricas demostró un LOD de  $\sim 8$  ng / mL y  $\sim 2$  ng / mL con una concentración efectiva 50 (EC50) de  $\sim 78$  ng / mL y  $\sim 20$  ng / mL para IL-6 y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Se utilizaron tres estímulos químicos diferentes en células del músculo esquelético cultivadas en 2D para evaluar el compuesto más efectivo para la liberación de ambas citoquinas. Entre la cafeína, el LPS y la dexametasona, el más efectivo fue el LPS.



**Figura 3.** Descripción y caracterización del sistema de detección multiplexada en el sitio. (A) Representación esquemática de los pasos para el inmunoensayo sandwich como mecanismo de detección. (B) Disposición física del sistema de biosensores: 1) cubierta de células microfluídicas de PMMA; 2) electrodo funcionalizado SPGEs; 3) Caja de soporte de electrodos de acero inoxidable; 4) Cámara de detección de células junto con conectores microfluídicos; 5) Potenciostato. (C-D) Señales amperométricas crudas y curvas de calibración realizadas en medios de diferenciación y en condiciones fluidicas para (C) IL-6 y (D) TNF- $\alpha$ . Las curvas muestran límites de detección de  $8$  ng mL<sup>-1</sup> y  $2$  ng mL<sup>-1</sup> para IL-6 y TNF- $\alpha$ , respectivamente.



Estos trabajos han dado lugar a dos publicaciones:

1. **"Muscle-on-a-chip with an on-site multiplexed biosensing system for in situ monitoring of secreted IL-6 and TNF- $\alpha$ ."** M. A. Ortega, et al. Lab on a Chip. (2019).  
<https://doi.org/10.1039/C9LC00285E>
2. **"Microphysiological sensing platform for an in-situ detection of tissue-secreted cytokines."** A. Hernández-Albors, et al. Biosensors and Bioelectronics: X. (2019).  
<https://doi.org/10.1016/j.biosx.2019.100025>.

## CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo presentamos la primera **plataforma microfluidica** compleja para el cultivo de células musculares esqueléticas integradas en un andamio diseñado en 3D junto con un sistema de detección de GSPE personalizable para el estudio del metabolismo muscular en condiciones de salud y enfermedad. Esta tecnología revolucionaria se puede exportar a cualquier entorno de laboratorio con un gran impacto en el **proceso de detección y cribado de fármacos**.

## DETALLE DE LOS GASTOS IMPUTADOS

Este proyecto ha contado con una financiación total de **22.000€**. Esta aportación se ha destinado, por un lado, a la compra de fungible de laboratorio (4.300€). Este fungible engloba principalmente reactivos, material de cultivo celular y materiales de microfabricación. Específicamente, se ha adquirido materiales como tropoelastina, fotoiniciador UV, gelatina tipo A, líneas celulares C2C12, medio de cultivo celular, factores de diferenciación, suero, tripsina, artículos de plástico, cristalería, tubos de microscopía de fuerza atómica, anticuerpos marcados con fluorescencia, materiales de microscopía electrónica de barrido, fluorescentes tintes, materiales de microfabricación (masters SU-8, PDMS, diapositivas) y otros reactivos químicos. Dichos consumibles han sido indispensables para poder desarrollar correctamente las tareas del proyecto.

Por otro lado, esta financiación se ha utilizado para cubrir el sueldo de un investigador postdoctoral durante siete meses (17.700€). Este investigador postdoctoral tenía conocimientos científicos previos en los campos de biomateriales y metabolismo, que ha contribuido a la correcta ejecución de las tareas del proyecto. Durante este tiempo, ha llevado a cabo la mayoría de los experimentos en relación con la generación del material andamio para el establecimiento del modelo de músculo esquelético in vitro, así como el posterior análisis de la respuesta celular mediante biosensores.