

# **Informe Justificativo Final de proyecto**

## **Campaña Faster Future “A por la COVID-19”**

*Fecha de presentación del informe: 01 de Diciembre de 2022*

## DATOS DEL PROYECTO

---

Dada la relevancia de la investigación para conseguir un tratamiento que disminuya las incidencias de la enfermedad, el programa IBEC “A por la COVID-19” se compone de tres proyectos complementarios y necesarios liderados por grupos de investigación IBEC en colaboración con clínicos y asociaciones de pacientes. Dichos proyectos tienen como objetivo, a través de diferentes aproximaciones al virus y la enfermedad que la causa, mejorar el diagnóstico y la terapia, tanto para pacientes que estén sufriendo la enfermedad como para aquellos que la hayan superado.

Al tratarse de tres líneas de investigación complementarias lideradas por tres jefes de grupo de IBEC, la directora de traslación clínica del IBEC, Prof. Núria Montserrat, es la responsable del proyecto y está llevando la coordinación del programa “A por la COVID-19”. A continuación, detallamos cada uno de estos tres subproyectos:

### PROYECTO 1

**Título:** Organoides y edición genética para desenmascarar al virus

**Líder:** Prof. Núria Montserrat

**Laboratorio:** “Pluripotency for Organ Regeneration” <http://www.ibecbarcelona.eu/iPSCs>.

**Memoria del proyecto:** La estructura completa de la proteína ACE2, la principal puerta de entrada del virus SARS-CoV2 en el organismo humano fue descubierta y publicada en la literatura científica hace apenas seis meses. Para poder estudiar la interacción que desencadena la replicación del virus y su posterior enfermedad, se crearán organoides de riñón y corazón en IBEC, una técnica asequible económicamente y que, a la vez, acelera los resultados y evita la investigación animal. Dichos organoides serán infectados con el virus para su estudio y se utilizarán técnicas de edición genética para perturbar la presencia de las moléculas que actúan como puertas de entrada. Se pretende conocer si dichas puertas pueden ser modificadas (abrir las o cerrarlas) con medicamentos para, de esta forma, ayudarnos a entender los primeros pasos del virus en el cuerpo humano. Entender este proceso nos ayudará finalmente a pensar estrategias que eviten su propagación y puedan reenfocar o diseñar tratamientos para reducir la carga viral de SARS-CoV2 en nuestros órganos. En colaboración con el Hospital Universitario Fundación Jimenez Diaz en Madrid y el Hospital Clínic en Barcelona, se validarán todos los resultados obtenidos utilizando muestras clínicas procedentes de biopsias de pacientes infectados y transfiriendo nuestros resultados a la práctica clínica en pacientes con COVID-19. Se pretende hacer especial énfasis en aquellos pacientes que sufran enfermedades renales crónicas, pues tienen mayor predisposición a sufrir el COVID-19 de forma severa.

**Colaboradores externos:** Hospital Universitario Fundación Jimenez Diaz en Madrid y el Hospital Clínic en Barcelona, Federación ALCER (asociación de pacientes para la lucha contra enfermedades de riñón).

## PROYECTO 2

**Título:** Liberación de nanofármacos como terapia para la COVID-19

**Líder:** Prof. Giuseppe Battaglia

**Laboratorio:** “Molecular bionics” <http://www.ibecbarcelona.eu/molecular-bionics/>

**Memoria del proyecto:** Para poder conseguir una rápida traslación clínica a los pacientes de COVID-19, el proyecto busca la reutilización de fármacos usando un selectivo sistema de encapsulamiento y liberación de medicamentos, los polimerosomas, transportadores sintéticos que pueden viajar por el torrente sanguíneo durante 18 horas hasta alcanzar su objetivo. Estos nuevos constructos deben poder dirigirse y acceder únicamente a células infectadas por SARS-CoV2, cargados de la combinación de fármacos con demostrada actividad antiviral y liberar su carga a nivel intracelular donde el virus se esconde y prospera. El objetivo es conseguirlo de manera más efectiva y sin provocar efectos secundarios.

Para ello, deberemos conocer en profundidad el virus y aquellos parámetros asociados a la enfermedad que serán clave para que nuestra estrategia sea exitosa como (a) la composición de los receptores celulares y de tejidos (b) su ubicación anatómica (c) respuestas inmunes asociadas. Esta aproximación que ha servido para cáncer y otras enfermedades, vamos a tratar de aplicarla a COVID19. Primeramente, hemos diseñado un mapa detallado de la interacción molecular del virus, receptor a receptor, disponiendo así de un mapa que correlacione su infectividad con el fenotipo de tejidos y células. Se pretende entender el rol que los diferentes receptores pueden tener en la replicación del virus (no únicamente el del receptor ACE2), gracias a análisis computacional. Con este conocimiento más asentado, podremos entender mejor el comportamiento del virus y a través de machine-learning reorientar y optimizar aquellos polimerosomas ya existentes (los transportadores) para que puedan ser más efectivos y probarlos con distintos medicamentos. Una vez elegidos, llevaremos a cabo el desarrollo y ensayo del nanofármaco para probar *in vitro* e *in vivo* su poder antiviral y antiinflamatorio antes de su suministro en humanos.

**Colaboradores externos:** Royal Free Hospital de Londres y el Huaxi Hospital Chengdu de China.

## PROYECTO 3

**Título:** Estudio de las secuelas musculares en pacientes que han superado la enfermedad COVID19

**Líder:** Prof. Javier Ramon

**Laboratorio:** “Biosensors for bioengineering” <http://www.ibecbarcelona.eu/biosensors>

**Memoria del proyecto:** Un porcentaje aún desconocido de supervivientes de COVID-19 experimentan una variedad de síntomas de los que se recuperan habitualmente en pocos días. Sin embargo, hay otros pacientes que incluso después de superar la enfermedad, desarrollan secuelas que pueden durar meses. Generar conocimiento sobre los potenciales efectos a largo plazo de la enfermedad también es una necesidad que debe abordarse.

El proyecto busca poner el foco en aquellas personas que han superado la enfermedad y pretende (a) Explorar datos epidemiológicos y factores de riesgo (admisiones en UCI, comorbilidades, medicación y régimen de tratamiento durante la fase aguda y de recuperación) asociados con aquellos efectos/resultados de la enfermedad (readmisiones, estado de salud mental y severidad de la enfermedad) en cohortes de pacientes que han cumplido entre 6-9

meses desde su diagnóstico. (b) Análisis proteómico en sangre con largo y corto plazo de casos post-COVID19 (c) Análisis del efecto en suero de paciente en cultivos 2D in vitro de músculo esquelético primario (d) Adaptar el proyecto a dispositivos de músculo en un chip ya existentes como plataforma para explorar la efectividad y otras variables de potenciales fármacos (p.ej. Remdesivir) en tejidos musculares y poder estudiar secuelas como mialgias que puedan desarrollar los pacientes post-COVID19.

**Colaboradores externos:** Hospital Vall d'Hebron y el Hospital de la Santa Creu y Sant Pau.

### **PALABRAS CLAVE**

Enfermedad de COVID-19, organoides riñón, receptor ACE2, edición genética, polimerosomas, liberación fármacos, análisis computacional, secuelas largo-plazo, músculo en chip.

## PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

### PROYECTO 1: Organoides y edición genética para desenmascarar al virus

#### 1. Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una enfermedad infecciosa causada por el SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Los pacientes con COVID-19 muestran síntomas similares a los de la influenza que oscilan desde una enfermedad leve hasta una lesión pulmonar grave. Un alto porcentaje de pacientes graves con COVID-19 muestran síntomas en otros órganos, sobre todo en el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular y los riñones. Varias condiciones se han relacionado con el riesgo de desarrollar COVID-19 grave, incluida la predisposición genética, la obesidad relacionada con las respuestas inmunitarias o la diabetes mellitus (DM). Tanto el COVID-19 como la DM están asociados con inflamación aguda y crónica, y ambas enfermedades pueden afectarse entre sí en términos de progresión clínica y resultado de la enfermedad. pacientes hospitalizados. En esta línea, ya se han informado tasas más altas de mortalidad en pacientes con DM preexistente.

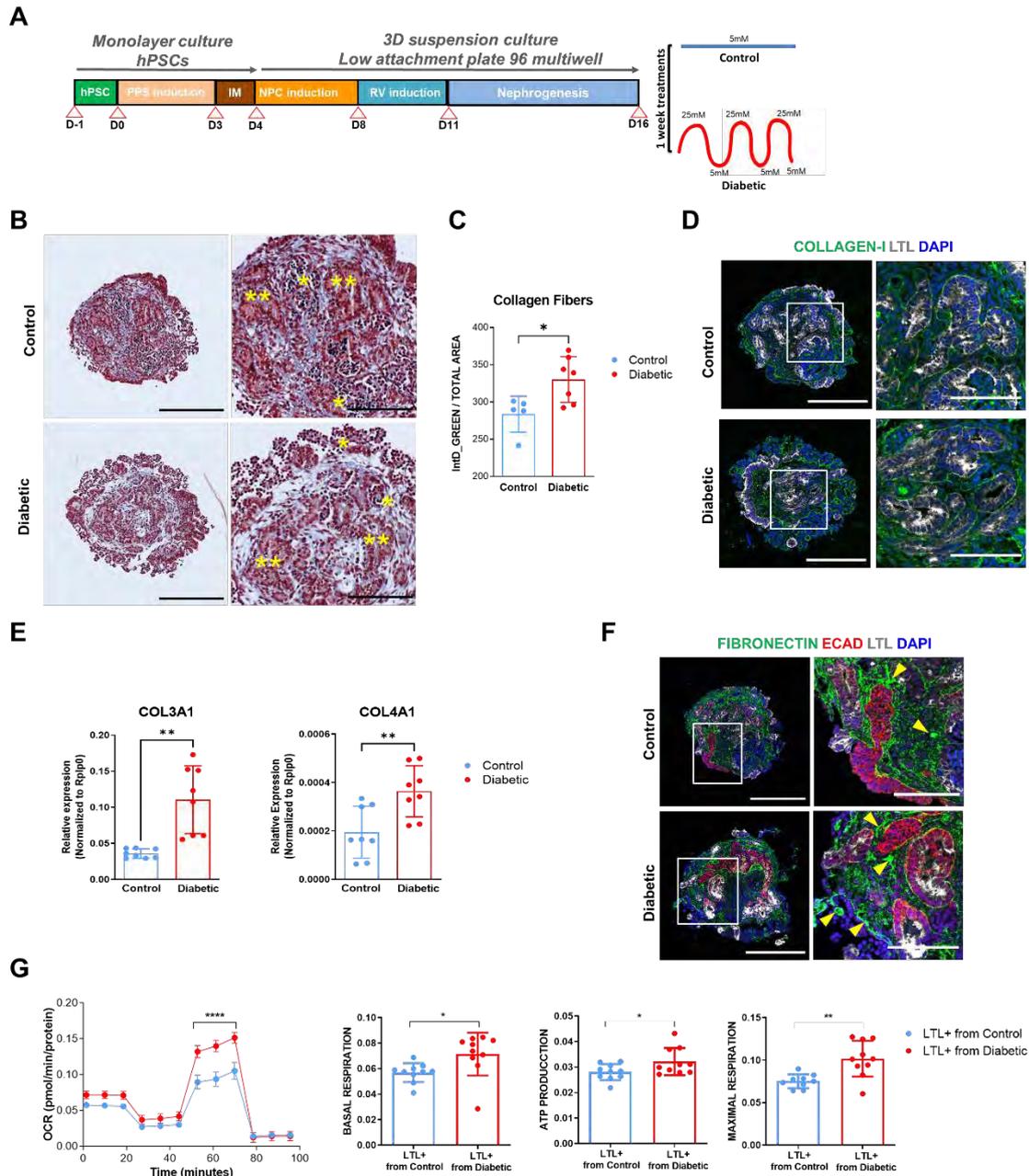
Hemos demostrado anteriormente que los organoides renales y vasculares derivados de células madre pluripotentes humanas (hPSC) pueden ser infectadas por SARS-CoV-2 y esto es bloqueado en presencia de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) soluble recombinante humana de grado clínico. Sin embargo, además de la gran utilidad de los organoides en la investigación del SARS-CoV-2, aún no se han desarrollado organoides que modelen las comorbilidades humanas asociadas con la COVID-19 grave, como es el caso de la DM.

#### 2. Resultados

##### Generación de organoides de riñón humano diabético

Para estudiar el impacto de la hiperglucemia en las células renales en las infecciones por SARS-CoV-2, establecimos un procedimiento novedoso para generar organoides renales similares a los diabéticos a partir de hPSC. Adaptando nuestro protocolo anterior, primero indujimos el "posterior primitive streak" (PPS), exponiendo la monocapa de hPSC (día 0) al agonista de Wnt CHIR (8  $\mu$ M) durante 3 días. Luego, las células comprometidas a PPS se cultivaron en FGF9 (200 ng/mL), activina-A (10 ng/mL) y heparina (1  $\mu$ g/mL) durante 24 h para promover el mesodermo intermedio posterior (PIM). En el día 4, los progenitores comprometidos con PIM se trataron con CHIR (5  $\mu$ M), FGF9 (200 ng/mL) y heparina (1  $\mu$ g/mL) durante 1 h, y posteriormente se agregaron en esferoides que contenían células progenitoras de nefronas (NPC) (día 8). En presencia de FGF9 (200 ng/ml), los esferoides NPC formaron estructuras de vesículas renales (RV) autoorganizadas (día 11). A partir de esa etapa, los RV se desarrollaron de forma autónoma en estructuras similares a nefronas segmentadas flotantes hasta el día 16 (nefrogenesis) (Figura 1A). Los pacientes diabéticos exhiben niveles oscilatorios de glucosa con episodios diarios de hipo e hiperglucemia, lo que se cree que es importante para impulsar las patologías asociadas a la DM. De hecho, el término "memoria metabólica" engloba las alteraciones patogénicas inducidas por la hiperglucemia mucho tiempo después de haber logrado el control glucémico. Para emular las oscilaciones de los niveles de glucosa similares a las de los pacientes diabéticos in vitro, determinamos las concentraciones óptimas de glucosa y los puntos de tiempo para establecer las condiciones "diabéticas". Después de múltiples experimentos piloto (datos no mostrados), delineamos una configuración de cultivo usando glucosa baja continua (5 mM, denominada "condiciones de control") o glucosa alta de forma

oscilatoria (alternando de 5 a 25 mM cada 24 horas, denominada condiciones "diabéticas") (**Figura 1A**). Es importante destacar que el tratamiento con glucosa alta oscilatoria resultó en un marcado aumento en la deposición de fibra de colágeno en los organoides renales en comparación con los controles de glucosa baja (**Figura 1B-D**). También observamos una regulación positiva de la expresión de colágeno III y colágeno IV por qPCR (**Figura 1E**). De manera similar, se detectaron depósitos de fibronectina en las áreas tubulointersticiales dentro de los organoides renales (**Figura 1F**). La reducción en los niveles de PGC1 alfa fue concomitante con aumentos en la tasa máxima de consumo de oxígeno (OCR), una medida de la respiración mitocondrial, la respiración basal y máxima, así como la síntesis de ATP (**Figura 1G**). Cabe destacar que nuestros resultados están en línea con una mayor capacidad mitocondrial en las células tubulares proximales evaluadas mediante la medición de OCR en las primeras fases de la diabetes en modelos animales (1 a 4 semanas después de la inducción de la diabetes). En resumen, nuestros datos muestran que la exposición de organoides renales humanos a niveles altos de glucosa oscilatoria conduce a cambios transcripcionales, alteraciones de la ECM y reestructuración mitocondrial metabólico en células tubulares, características iniciales de la enfermedad renal diabética. Nuestro sistema de cultivo también permitió la generación de células similares a túbulo proximales LTL+ que recapitulan las características de un fenotipo similar a diabetogénico temprano después de la eliminación del insulto diabetogénico, indicativo de memoria metabólica.



**Figura 1. Las condiciones de glucosa oscilatoria alta inducen las primeras características de la enfermedad renal diabética en organoides renales humanos.**

A) Esquema experimental para la generación de organoides de riñón humano a partir de hPSC.

B) Tinción tricrómica de Masson de organoides renales de control o diabéticos. Se muestran las estructuras glomerular (\*) y tubular (\*\*). Barras de escala, 250  $\mu$ m, 100  $\mu$ m (vistas ampliadas).

C) Cuantificación correspondiente de las fibras de colágeno de B). El eje Y representa la intensidad integrada. Los datos son la media  $\pm$  s.d. de al menos n = 5 réplicas experimentales independientes por condición. \*P < 0,05, prueba t de Student no pareada.

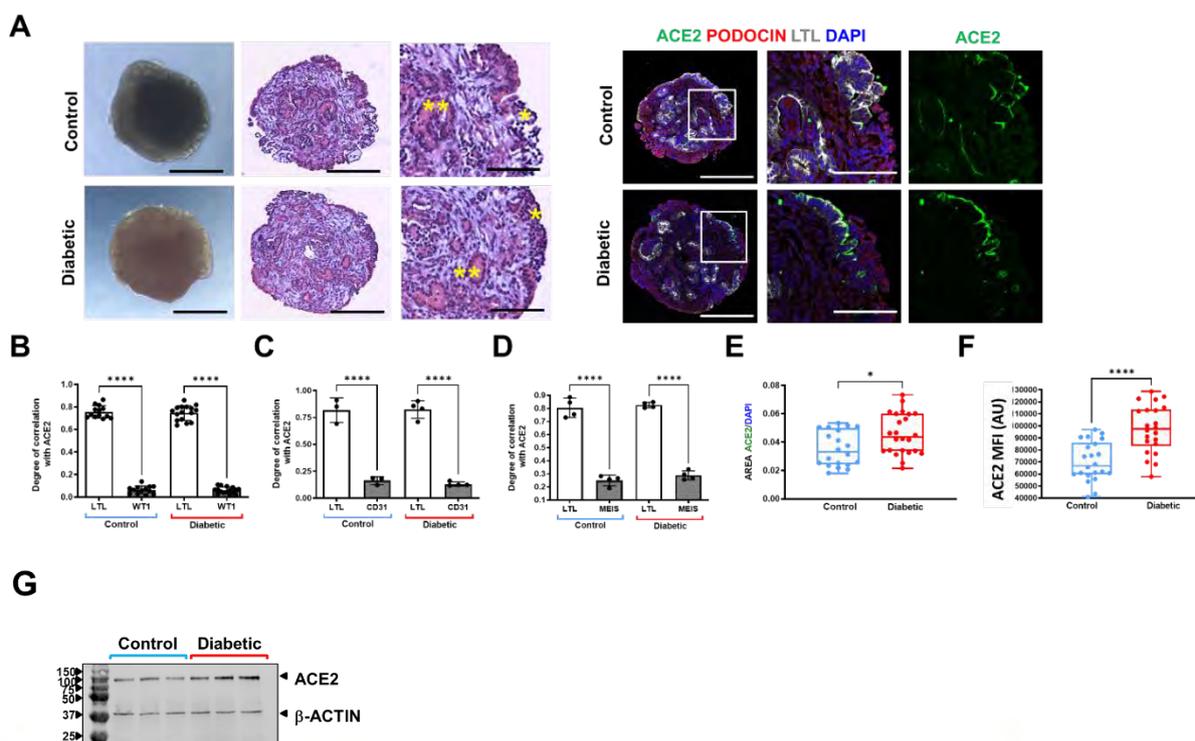
D) Tinción de inmunofluorescencia representativa para COLÁGENO-I (verde), LTL (gris) y DAPI (azul) en organoides renales de control o diabéticos. Barras de escala, 250  $\mu$ m, 100  $\mu$ m (vistas ampliadas).

E) Niveles de expresión de ARNm de COL3A1 y COL4A1 en organoides de riñón control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 3 réplicas biológicas independientes de un grupo de 12 organoides/grupo con dos réplicas técnicas cada una. \*\*P < 0,01, prueba t de Student no pareada.

F) Tinción de inmunofluorescencia representativa para FIBRONECTINA (verde), E-CADHERINA (ECAD; rojo), LTL (gris) y DAPI (azul) en organoides renales de control o diabéticos. Barras de escala, 250  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  (vistas ampliadas). Las flechas amarillas resaltan los sitios de depósitos de fibronectina. G) Análisis de Seahorse en células LTL+ aisladas de organoides de riñón control o diabéticos. Los datos de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se normalizan a la proteína total. Los datos son medias  $\pm$  s.d.  $n = 10$  réplicas biológicas/grupo. \*\*\*\* $P < 0,0001$ , ANOVA de dos vías, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. La respiración basal y la capacidad respiratoria de reserva, la producción celular de ATP y la respiración máxima se muestran como media  $\pm$  s.d.  $n = 10$  réplicas biológicas/grupo. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,005$ , prueba t de Student no pareada.

## Las condiciones diabéticas inducen la expresión de ACE2 en organoides de riñón humano

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) se ha identificado previamente como un receptor clave de la superficie de la célula huésped requerido para la infección del SARS-CoV-2. Cabe destacar que ACE2 también se ha demostrado que controla la progresión de CDK en múltiples modelos animales. Aunque se ha mostrado que la glucosa puede inducir la expresión de ACE2 en líneas celulares, aún es controvertido si la DM da como resultado una regulación al alza o a la baja de ACE2, por lo que es fundamental analizar los efectos de la glucosa en la expresión de ACE2 en cultivos complejos similares a tejidos humanos como organoides. Nuestro análisis indicó que en los organoides renales, las células que expresan ACE2 se detectan predominantemente en las células del túbulo proximal LTL+, como se muestra mediante inmunofluorescencia (**Figura 2A**). La cuantificación de imágenes de células ACE2+LTL+ se evaluó junto con marcadores de diferentes compartimentos renales, incluido el marcador de podocitos WT1, el marcador de células endoteliales CD31 y el marcador de estroma MEIS1/2/3 (**Figura 2B-D**), mostrando en general un patrón de expresión similar de ACE2 a la que se encuentra en el riñón nativo humano y de ratón. Es importante destacar que el tratamiento con glucosa oscilatoria promovió una regulación positiva significativa de la expresión de ACE2 en comparación con las condiciones de control a nivel de proteína (**Figura 2 E-G**) y ARNm (**Figura 2H**). En conclusión, un entorno diabético promueve una importante regulación positiva de ACE2 en células tubulares proximales en organoides de riñón humano.



## Figura 2. Las condiciones diabéticas inducen la expresión de ACE2 en organoides de riñón humano y promueve las infecciones por SARS-CoV-2.

A) Imágenes representativas de campo claro y tinción con hematoxilina y eosina de organoides renales diabéticos o de control. Los asteriscos resaltan células similares a podocitos (\*) o estructuras similares a tubulares (\*\*). Las secciones consecutivas se tiñeron para ACE2 (verde), PODOCIN (rojo) y usando Lotus Tetraglobus Lectin (LTL, marcador de células tubulares, gris) y DAPI (azul). Barras de escala, 250  $\mu$ m, 100  $\mu$ m (vistas ampliadas).

B) Cuantificación de la colocalización de ACE2 con células LTL+ y WT1+ en organoides renales de control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 13 (control) y n = 16 (diabéticos) organoides por condición. \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

C) Cuantificación de la colocalización de ACE2 con células LTL+ y CD31+ en organoides de riñón de control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 3 (control) y n = 4 (diabéticos) organoides por condición. \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

D) Cuantificación de la colocalización de ACE2 con células LTL+ y MEIS+ en organoides renales de control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 4 (control) y n = 4 (diabéticos) organoides por condición. \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

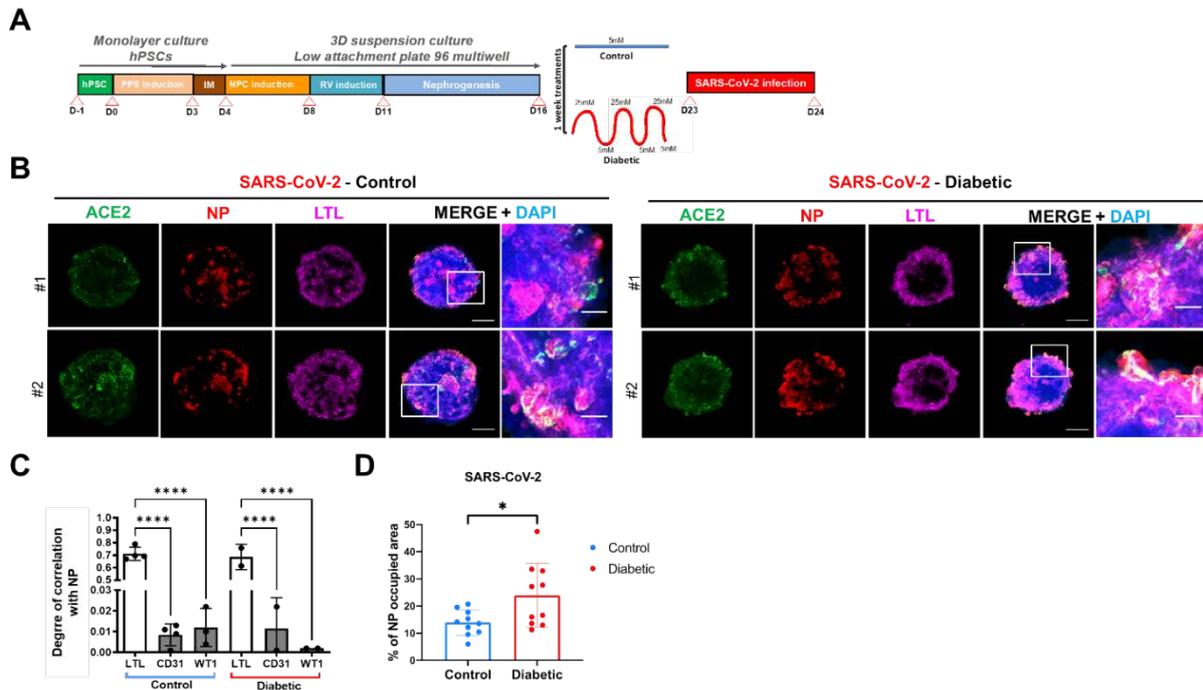
E) Cuantificación del área de células ACE2+ en organoides de riñón Control o Diabético. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 20 (control) y n = 24 (diabéticos) organoides. \*P < 0,05, prueba t de Student no pareada.

F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI como unidades arbitrarias; AU) de células ACE2+ en organoides de riñón de control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 6 (control) y n = 6 (diabéticos) organoides. \*\*\*\*P < 0,0001, prueba t de Student no pareada.

G) Los niveles de proteína de ACE2 en organoides de riñón de control o diabéticos se muestran mediante Western Blot. Se utilizó  $\alpha$ -ACTINA como control de carga. Se muestra la cuantificación correspondiente. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 3 réplicas biológicas independientes de un conjunto de 12 organoides/grupo; \*P < 0,05, prueba t de Student no pareada.

### Aumento de la infección por SARS-CoV-2 en organoides renales diabéticos

En base en nuestros resultados descritos, nuestro objetivo fue evaluar el impacto de los cambios de tipo diabético en los organoides renales en las infecciones por SARS-CoV-2. Para eso, los organoides renales diabéticos y de control se infectaron con SARS-CoV-2, se recuperaron un día después de la infección (1 dpi) (**Figura 3A**) y se analizaron mediante inmunofluorescencia de montaje completo. Los organoides control se infectaron según lo detectado por inmunotinción para proteína nuclear viral (NP) (**Figura 3B**). Las células infectadas dentro de los organoides correspondían principalmente células tubulares proximales ACE2+ y LTL+ (**Figura 3C**). Sorprendentemente, los organoides expuestos al medio diabético mostraron infecciones por SARS-CoV-2 significativamente aumentadas según la cuantificación del porcentaje de células virales NP+ en todo el organoide mediante microscopía confocal (**Figura 3D**).



**Figura 3. Infección de organoides renales de control o diabéticos con SARS-CoV-2**

A) Esquema experimental para la infección de organoides renales Control o Diabéticos con SARS-CoV-2.

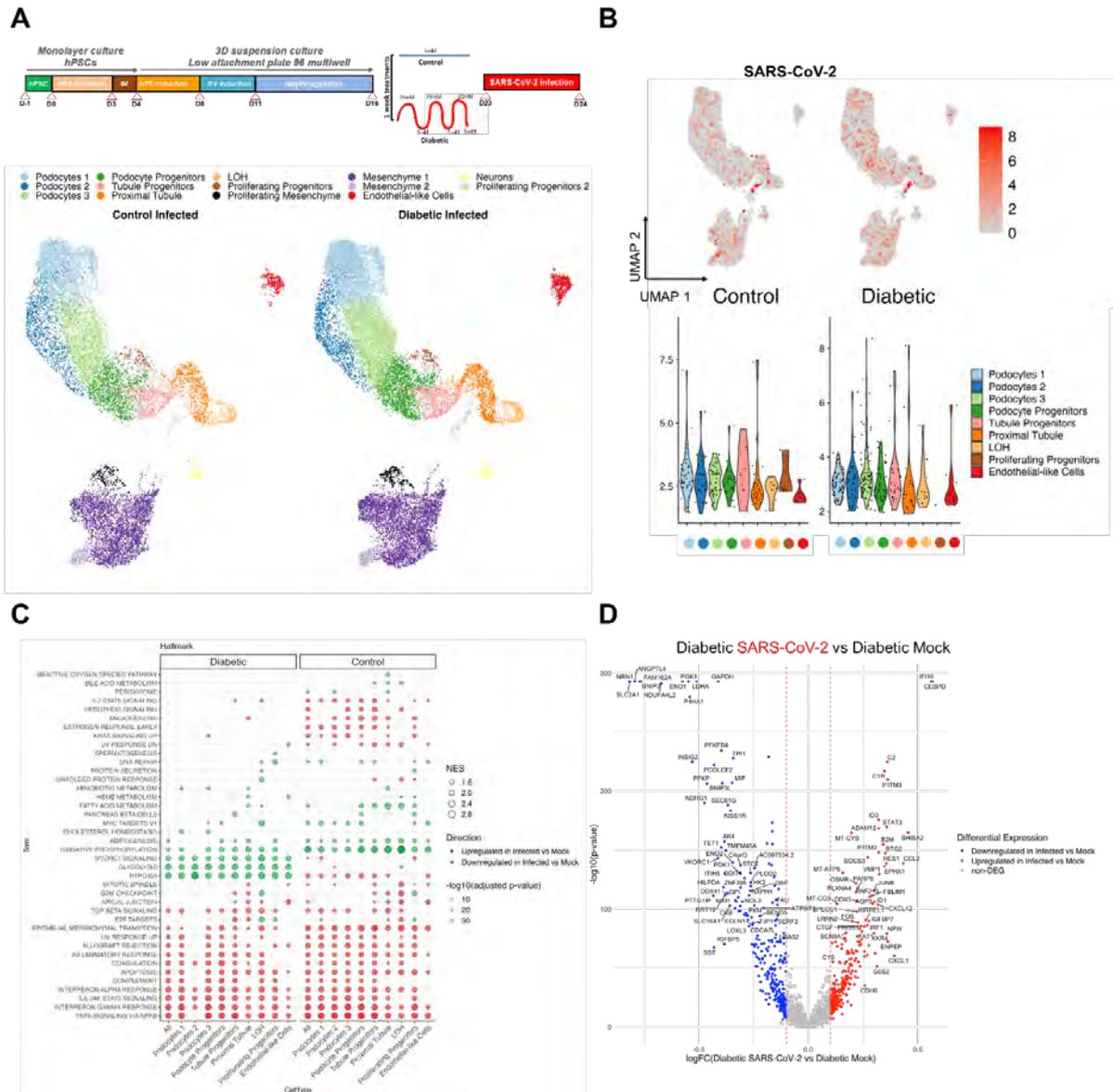
B) Inmunofluorescencia de organoides renales de control y diabéticos a 1 dpi con SARS-CoV-2 para ACE2 (verde), proteína nuclear viral (NP; rojo), LTL (magenta) y DAPI (azul). Barras de escala, 250  $\mu$ m, 50  $\mu$ m (vistas ampliadas). n = 2 organoides por condición.

C) Cuantificación de la colocalización de NP viral con células LTL+, CD31+ y WT1+ en organoides de riñón control o diabéticos. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 3 control y n = 3 organoides diabéticos. \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

D) Cuantificación del área de células NP+. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 5 Control y n = 5 organoides de riñón diabético realizando dos réplicas técnicas cada uno. \*P < 0,05, prueba t de Student no pareada.

Para evaluar los posibles cambios transcripcionales inducidos por el SARS-CoV-2, realizamos la secuenciación de ARN de una sola célula (scRNAseq) en 4 condiciones biológicas (simulacro y 1 dpi, en organoides renales tratados con glucosa 5 mM y glucosa alta oscilatoria). Los tipos de células en los organoides renales se asignaron mediante un agrupamiento no supervisado (“unsupervised clustering”) después de integrar el control frente a las condiciones de infección diabética y el algoritmo *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) para visualizar los datos de scRNAseq (**Figura 4A**). Recuperamos poblaciones de células tubulares, mesenquimales, endoteliales, proliferantes, de podocitos y renales en las cuatro muestras experimentales, lo que indica que aparentemente ni las condiciones diabéticas ni las infecciones por SARS-CoV-2 alteraron las composiciones celulares en los organoides renales. Los organoides de las cuatro condiciones contenían células representativas de una nefrona en desarrollo, incluidas células de tipo endotelial ENG+ y PECAM1+, podocitos NPHS1+ y NPHS2+, células del túbulo proximal LRP2+ y SLC3A1+ y células del túbulo distal CDH1+, que se asemejan a las poblaciones de células renales fetales humanas del segundo trimestre. Los organoides de riñón diabético a 1dpi nuevamente mostraron un mayor número de células que contenían ARN viral en comparación con los organoides de control (**Figura 4B**), lo que confirma de nuevo nuestros resultados. Como se esperaba tras una infección activa, las infecciones por SARS-CoV-2 dieron como resultado un aumento de los procesos relacionados con la inflamación en los organoides renales bajo control y en condiciones diabéticas (**Figura**

**4C)** de acuerdo con hallazgos previos en organoides renales que muestran un aumento de la señalización profibrótica, daño celular, y respuestas inflamatorias impulsadas por la infección por SARS-CoV-2. Nuestros resultados también mostraron que las infecciones por SARS-CoV-2 también se asociaron con la regulación a la baja de los procesos relacionados con la glucólisis en organoides diabéticos (**Figura 4C**). Además de la glucólisis alterada, el análisis de expresión génica diferencial mostró un aumento de la inflamación (p. ej., genes de la familia CXCL) y vías relacionadas con la diabetes (p. ej., CEBPD, STAT3) en los organoides renales diabéticos infectados con SARS-CoV-2 en comparación con sus homólogos no diabéticos (datos no mostrados en este informe).



**Figura 4. La programación metabólica inducida por condiciones diabéticas en organoides de riñón humano promueve la infección por SARS-CoV-2.**

A) Algoritmo *Uniform manifold approximation and projection* (UMAP) de organoides renales diabéticos o de control a 1 dpi con SARS-CoV-2. Los grupos están coloreados según el tipo de células indicadas.

B) UMAP para la expresión de SARS-CoV-2 en organoides renales de control o diabéticos a 1 dpi. Para SARS-CoV-2, la expresión se considera indetectable para las células que expresan  $< 5$  UMI. Las células están coloreadas según el nivel de expresión. Los gráficos de violín en los paneles inferiores representan  $\geq 5$  niveles de expresión de UMI para los diferentes tipos de células indicados.

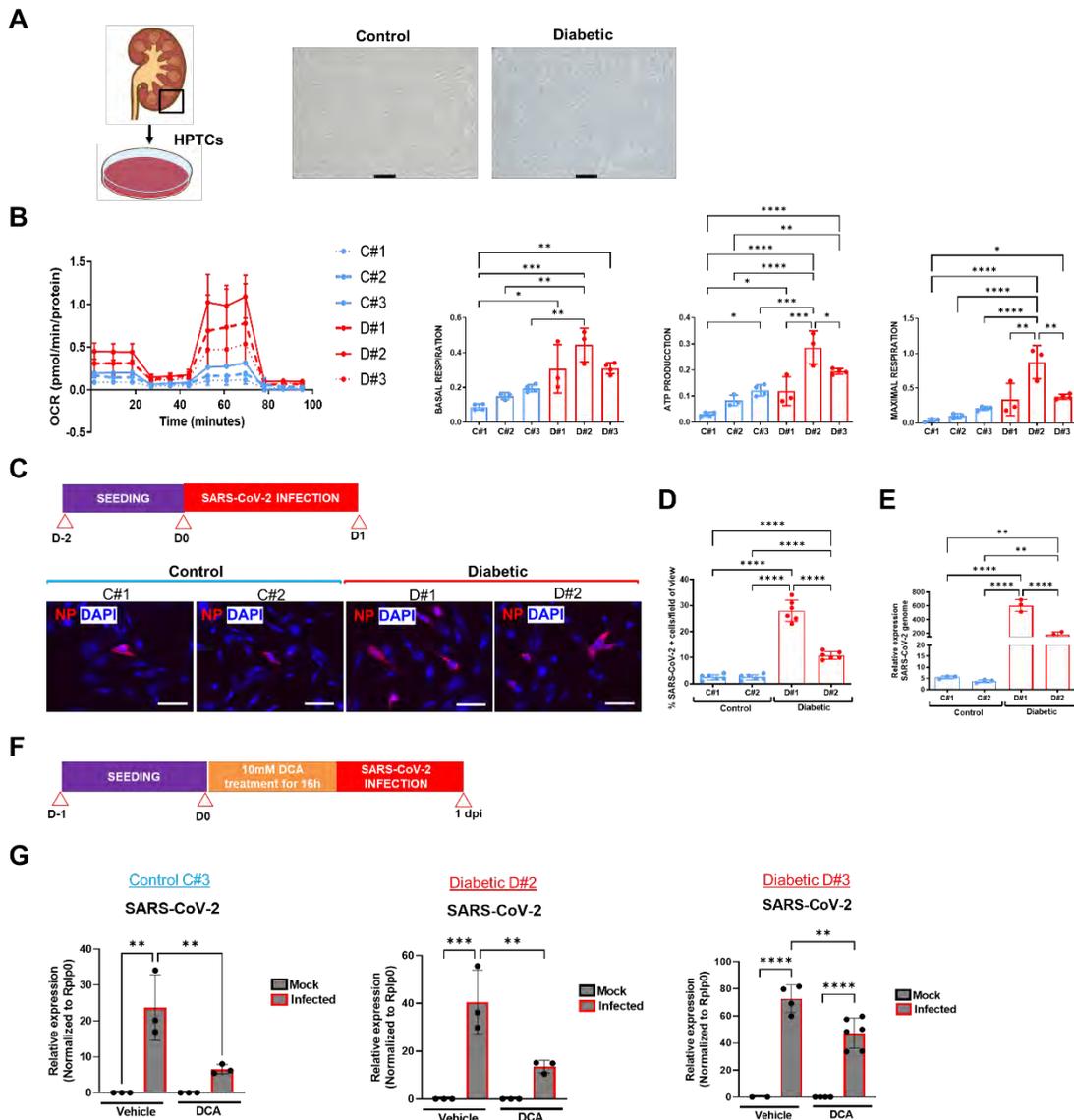
C) Se realizó un GSEA distintivo por separado para condiciones de control y diabéticas, comparando organoides infectados con SARS-CoV-2 versus control (*Mock*). Se muestran los diez conjuntos de genes por dirección y muestra con el valor p ajustado más bajo. Cada columna corresponde a una de las comparaciones. Los círculos están codificados por color (dirección), tamaño (NES) y transparencia (valor p).

D) Genes expresados diferencialmente (DEG) en la comparación de SARS-CoV-2 infectados con organoides simulados en condiciones diabéticas considerando solo tipos de células similares a las renales. En el gráfico, el eje x indica el *log fold change* (FC) y el eje y indica la significación estadística con el  $-\log_{10}$  (valor p). Los genes con un valor p ajustado  $< 0,05$  se consideran regulados al alza (rojo).

### Aumento de la infección por SARS-CoV-2 en células renales de pacientes diabéticos

Recientemente se ha demostrado que el SARS-CoV-2 puede infectar directamente las células renales. Sin embargo, aún no se comprende por completo si el daño renal observado es el resultado de la infección directa de las células renales diana o de respuestas indirectas al daño. Aunque nuestros datos muestran inequívocamente que los organoides renales pueden infectarse a través de la ACE2, también queríamos estudiar las infecciones por SARS-CoV-2 de células renales humanas primarias. Para ello aislamos células tubulares proximales humanas de riñón (HPTC) de biopsias renales de pacientes diabéticos y no diabéticos (control) gracias a nuestra colaboración con el Hospital Clinic de Barcelona (**Figura 5A**). Los niveles de ARNm de PGC1a se redujeron significativamente en los HPTC diabéticos en comparación con los controles, en paralelo con nuestros hallazgos en los organoides diabéticos y las células LTL + aisladas de organoides renales diabéticos. Además, los HPTC aislados de biopsias renales diabéticas exhibieron una mayor OCR, respiración basal, producción de ATP y capacidad respiratoria máxima en comparación con los control (**Figura 5B**) y mayores niveles de ARNm de LDHA. Cabe destacar que también observamos una mayor expresión de ACE2 en HPTC de pacientes diabéticos. Es importante mencionar que, después de las infecciones por SARS-CoV-2, detectamos un mayor número de células virales NP+ en HPTC diabéticos en comparación con las células renales aisladas de riñones de controles no diabéticos (**Figura 5D,E**). Además, las muestras de pacientes diabéticos tenían cantidades significativamente más altas de ARN viral según lo detectado por qPCR (**Figura 5F**). Estos datos muestran que las células tubulares proximales humanas de pacientes diabéticos presentan un aumento de las infecciones por SARS-CoV-2.

El aumento de OXPHOS y glucólisis en HPTC de pacientes diabéticos nos llevó a explorar los mecanismos moleculares en la interfaz entre la glucólisis y OXPHOS durante las infecciones por SARS-CoV-2. Para evaluar el papel de OXPHOS en la infección viral, tratamos las células con dicloroacetato (DCA), un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa mitocondrial (PDK) que causa la activación de OXPHOS mitocondrial a expensas de la glucólisis. Es importante destacar que, cuando los HPTC derivados de controles y pacientes diabéticos se trataron con DCA, observamos una disminución significativa en la expresión del ARNm del SARS-CoV-2 (**Figura 5F,G**).



**Figura 5. Infección por SARS-CoV-2 en células epiteliales tubulares derivadas de biopsias de riñón humano diabético.**

A) Imágenes representativas de campo claro de HPTC de biopsias renales de pacientes diabéticos no diabéticos (control) o diabéticos. Barras de escala, 100  $\mu$ m.

B) Análisis Seahorse de HPTC de control y diabéticos. Los datos de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se normalizan a la proteína total. Se muestran la respiración basal, la producción celular de ATP y la respiración máxima. Los datos son medias  $\pm$  s.d. de al menos n = 3 réplicas biológicas/grupo. \*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005; \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

C) Esquema experimental para infección por SARS-CoV-2 en HPTC Control o Diabéticos. Inmunofluorescencia de HPTC control o diabéticos infectados a 1 dpi para la proteína nuclear viral (NP, rojo) y DAPI (azul). Barras de escala, 100  $\mu$ m.

D) Cuantificación de células NP+ en C). Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 2 réplicas biológicas independientes por condición realizando al menos seis réplicas técnicas. \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

E) Análisis de qPCR de HPTC de control o diabéticos infectados con SARS-CoV-2 a 1 ppp para la detección de ARNm de SARS-CoV-2. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 2 réplicas biológicas

independientes por condición con al menos tres réplicas técnicas. \*\*P < 0,01; \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

F) Esquema experimental para infección por SARS-CoV-2 en HPTC de control o diabéticos tratados con DCA o vehículo durante 16 horas antes de la infección.

G) Análisis de qPCR de HPTC de control o diabéticos infectados con SARS-CoV-2 o simulados expuestos a DCA o vehículo a 1 dpi. Los datos son la media  $\pm$  s.d. n = 1 experimento independiente con al menos dos repeticiones técnicas. \*\*P < 0,005; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001, ANOVA unidireccional, prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Aún no está claro por qué las personas diabéticas son más propensas a desarrollar COVID-19 grave. Aquí, hemos establecido un modelo organoide de riñón humano que mimetiza las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad renal humana en un marco diabético y una regulación al alza de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Tras la infección por SARS-CoV-2, las condiciones hiperglucémicas conducen a cargas virales notablemente más altas en los organoides renales en comparación con la normoglucemia. Los organoides renales infectados regularon a la baja la ACE2, y el análisis de expresión génica diferencial un día después de la infección mostró un cambio metabólico hacia una disminución de la glucólisis en los organoides renales diabéticos. Además, las células tubulares proximales humanas de biopsias de pacientes diabéticos mostraron una respiración mitocondrial alterada y una glucólisis mejorada, lo que resultó en un mayor número de infecciones por SARS-CoV-2 en comparación con los pacientes no diabéticos. De manera importante, modular la reprogramación metabólica inducida por la diabetes de las células de los pacientes con el regulador metabólico dicloroacetato, que activa la fosforilación oxidativa a expensas de la glucólisis, redujo notablemente las infecciones por SARS-CoV-2. Parte de estas observaciones se publicaron en la prestigiosa revista *Cell Metabolism* en la que reconocimos especialmente el apoyo del programa Faster Future “A por la COVID-19”. El manuscrito se publicó en mayo de 2022 y aquí también compartimos el impacto de nuestro trabajo en la prensa general, incluidos los periódicos, la radio y las redes sociales (ver resumen de impacto sobre los medios de comunicación a final del informe). Cabe destacar que los resultados también se publicaron recientemente en el artículo de “STAR” Protocols (ver apartado referencias).

## **RESUMEN DIVULGATIVO**

La posibilidad de generar cultivos celulares que se asemejan a nuestros órganos, los denominados organoides, permite entender cómo se generan nuestros órganos y entender enfermedades de origen genético, sistémico e infeccioso. En el proyecto *Organoides y edición genética para desenmascarar al virus*, financiado por la campaña Faster Future “A por la COVID-19”, hemos podido explotar la tecnología de los organoides de riñón para entender mecanismos esenciales en el funcionamiento del receptor ACE2, una de las puertas que el virus SARS-CoV-2 encuentra en nuestro organismo. Mediante técnicas que incluyen el uso de ingeniería genética y secuenciación de RNA hemos podido comprender el papel de ACE2 y otros receptores para SARS-CoV-2 en los primeros momentos de la infección viral. Este trabajo nos ha permitido identificar nuevos tratamientos para bloquear la infección SARS-CoV-2 en organoides de riñón y muestras de pacientes diabéticos.

## **EXPLICACIÓN DE LOS GASTOS**

En la campaña Faster Future “A por la COVID-19”, iniciada por el IBEC, el grupo de la Dra. Montserrat ha contado con 11.188,24€ para la ejecución del proyecto descrito en este informe, que se han ejecutado en su totalidad durante el período de vigencia del proyecto. Los fondos se

han destinado a la compra de reactivos necesarios para el cultivo de los organoides de riñón y de corazón (inhibidores, medios de cultivo o material de plástico necesario), para su posterior edición genética, además de para envío de muestras a sus colaboradores. Es importante destacar que, paralelo a los fondos obtenido dentro de la campaña, la Dra. Montserrat ha podido completar y ampliar el proyecto gracias a fondos captados en las convocatorias competitivas dirigidas al estudio del COVID-19 y que detallamos a continuación: “Development of a human cellular platform unveiling Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)-SARS-CoV-2 interactions”, de la *Convocatoria Urgente De Expresiones De Interés Para La Financiación Extraordinaria De Proyectos De Investigación Sobre El Sars-Cov-2 Y La Enfermedad Covid-19*, del Instituto de Salud Carlos III (189.000€), “Identifying SARS-CoV-2- host cell interactions exploiting CRISPR/Cas9 engineered human organoids: through the development of specific therapies against COVID19”, de la convocatoria *Ayudas a Equipos de Investigación Científica SARS-CoV-2 y COVID-19 en Ecología y Veterinaria, de la Fundación BBVA* (250.000€), “Exploiting organoid model systems to explore systemic conditions worsening COVID19: merging cellular and genetic engineering”, de la convocatoria de La Marató de TV3 para la Covid-19 (132.500€), “Modern approaches for developing antivirals against SARS-CoV 2”, de la convocatoria *Development of therapeutics and diagnostics combatting coronavirus infections*, del partnerariado Innovative Medicines Initiatives (499.982€) y “Respiratory Host-Pathogen Interaction”, de la convocatoria *Personalised medicine and infectious diseases: understanding the individual host response to viruses (e.g. SARS-CoV-2)* de la Comisión Europea (915.375€). Esta financiación adicional obtenida confirma el interés de esta línea de investigación llevada a cabo por el grupo y el potencial de los objetivos y resultados obtenidos.

## **REFERENCIAS**

### **A diabetic milieu increases ACE2 expression and cellular susceptibility to SARS-CoV-2 infections in human kidney organoids and patient cells**

Elena Garreta, Patricia Prado, Megan L. Stanifer, Vanessa Monteil, Andrés Marco, Asier Ullate-Agote, Daniel Moya-Rull, Amaia Vilas-Zornoza, Carolina Tarantino, Juan Pablo Romero, Gustav Jonsson, Roger Oria, Alexandra Leopoldi, Astrid Hagelkruys, Maria Gallo, Federico González, Pere Domingo-Pedrol, Aleix Gavaldà, Carmen Hurtado del Pozo, Omar Hasan Ali, Pedro Ventura-Aguiar, Josep María Campistol, Felipe Prosper, Ali Mirazimi, Steeve Boulant, Josef M. Penninger, **Nuria Montserrat**. *Cell Metabolism*, 34(6), 857-873.e9 - May 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.04.009>

### **Protocol for SARS-CoV-2 infection of kidney organoids derived from human pluripotent stem cells.**

Elena Garreta, Daniel Moya Rull, Megan L. Stanifer, Vanessa Monteil, Andrés Marco, Carolina Tarantino, Juan Ali Mirazimi, Steeve Boulant, Josef M. Penninger, **Nuria Montserrat**. *STAR Protoc.* 2022 Dec 16;3(4):101872. [doi: 10.1016/j.xpro.2022.101872](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101872).

## **PROYECTO 2:** Liberación de nanofármacos como terapia para la COVID-19

Nuestro planteamiento parte de un riguroso trabajo teórico en el que desconocemos los distintos elementos de la interacción del virus con los componentes celulares. Las largas y complejas cadenas de azúcares, llamadas glicanos, suelen recubrir la superficie de las células y de las proteínas. Los glicanos modulan interacciones específicas ligando-receptor y protegen a las células. En la superficie de la célula, estos azúcares dan lugar al glicocáliz, que forma como un cepillo alrededor de la célula. Es por tanto muy relevante el estudiar la entrada del virus en la célula combinando el efecto del cepillo de azúcares con los receptores tradicionales específicos del virus. En conjunto, estos datos orientan el desarrollo de tratamientos antivirales más eficaces. Un elemento crítico serán los glicanos naturales y varios estudios han demostrado que la heparina, un antitrombótico que se utiliza en la práctica clínica, puede inhibir la infección del coronavirus SARS-CoV-2. La heparina se une a las proteínas *spike* del virus deteniendo su interacción con los proteoglicanos de heparán sulfato, componentes críticos en la infección del virus.

### **CONCLUSIONES GENERALES**

En este proyecto, demostramos que las cadenas de heparán sulfato (HS) -que forman parte del glicocáliz -y otros glicanos- expresadas en la superficie de las proteínas del huésped y del virus, tienen un papel crítico en la modulación de los potenciales de atracción y repulsión durante la infección viral. Analizamos el virus SARS-CoV-2, modelando sus proteínas *spike* que se unen a las cadenas HS y a dos receptores de entrada clave, ACE2 y TMPRSS2. Incluimos el efecto de exclusión de volumen impuesto a las cadenas HS durante la inserción del virus en el glicocáliz y la repulsión estérica causada por los cambios en la conformación de los glicanos de ACE2 implicados en la unión a *spike*. A continuación, combinamos todas estas interacciones, demostrando que la interacción de todos estos componentes es fundamental para el comportamiento del virus. Demostramos que el tropismo del virus depende de la expresión combinada tanto de las cadenas HS como de los receptores. Por último, demostramos que cuando tanto las cadenas HS como los receptores de entrada se expresan en alta densidad, los efectos estéricos dominan la interacción, impidiendo la infección.

También elaboramos un modelo termodinámico simple de entrada viral, que es capaz de predecir las diferencias entre los virus. También demostramos que el glicocáliz, que a menudo se obvia en los estudios sobre las interacciones de entrada en la célula, desempeña un papel clave, y que la densidad y la estructura del glicocáliz pueden determinar si un virus puede entrar en la célula o no. Además, descubrimos que los correceptores no sólo desempeñan una función de señalización, sino también un importante papel termodinámico en la entrada del virus. A continuación, demostramos que este modelo puede utilizarse para calcular las probabilidades de entrada en la célula de un determinado virus, lo que puede arrojar luz sobre las observaciones clínicas asociadas a un virus. Por tanto, estas observaciones nos permiten ampliar la aplicación de este modelo a otros virus patógenos, con el consecuente impacto en el desarrollo de nuevos antivirales específicos para otras enfermedades víricas (Acosta Gutierrez 2022).

Además, también intentamos arrojar luz sobre los mecanismos de entrada viral. Elaboramos un modelo termodinámico simple de entrada viral, que es capaz de predecir las diferencias entre los virus. También demostramos que el glicocáliz, que a menudo se descuida en los estudios sobre la entrada en la célula, desempeña un papel clave, y que la densidad y la estructura del glicocáliz pueden determinar si un virus puede entrar en la célula o no. Además, descubrimos que los correceptores no sólo desempeñan una función de señalización, sino también un importante papel termodinámico en la entrada del virus. A continuación, demostramos que este modelo puede utilizarse para calcular las probabilidades de entrada en la célula de un

determinado virus, lo que puede arrojar luz sobre las observaciones clínicas asociadas a un virus (Buckely 2022).

En la segunda parte del proyecto, hemos sintetizado macromoléculas y nanopartículas modificadas con heparina que coexpresan el péptido Fc (FcM). La región Fc es el fragmento de anticuerpo que impulsa la unión rápida a las células inmunitarias estimulando las células fagocíticas o citotóxicas para destruir los patógenos. Combinaremos la unión al virus con la estimulación inmunitaria para acelerar la eliminación y, efectivamente, la inmunidad. Diseñaremos varias combinaciones de heparina y péptidos FcM, ya sea como macromoléculas individuales o como nanopartículas, para maximizar la neutralización del virus. Aplicaremos nuestro modelo de focalización fenotípica establecido para identificar las topologías de unión más eficaces para la focalización tanto del virus como de las células inmunitarias. Los evaluaremos mediante protocolos secuenciales *in vitro* e *in vivo* para medir la neutralización del virus y la respuesta inmunológica asociada.

Hemos producido virus pseudotipados que expresan la misma proteína *spike* que el virus de tipo salvaje. Ahora estamos avanzando en las pruebas de las nanomedicinas antivirales con modelos de interacción utilizando células endoteliales de pulmón y ACE de alta expresión. Ahora estamos diseñando nanopartículas multivalentes equipadas con unidades de unión a péptidos Fc y a virus, utilizando heparina o elementos que imitan a la heparina.

## **RESUMEN DIVULGATIVO**

Los glicanos son azúcares de expresión ubicua que recubren las superficies de las células y proteínas. Se encuentran en muchas proteínas en forma de cadenas cortas y ramificadas o de largas cadenas que sobresalen en proteínas de membrana especiales, conocidas como proteoglicanos. Este colchón de azúcares, el glicocáliz, modula interacciones específicas y protege a la célula. Hemos demostrado que tanto la expresión de los proteoglicanos como el de los glicanos expresados en la superficie de las proteínas del huésped y del virus tienen un papel crítico en la modulación de la adhesión viral a la célula. Construimos un modelo matemático utilizando el SARS-Cov-2 como virus arquetípico para estudiar el papel de los glicanos durante la infección. Se demuestra que esto ocurre a través de un “tira y afloja” de fuerzas donde, por un lado, las proteínas virales muestran un reconocimiento molecular multivalente hacia glicanos y receptores específicos del huésped y, por otro lado, la repulsión estérica de los glicanos que un virus debe superar para acercarse a dichos receptores específicos. Al equilibrar ambas interacciones, se puede predecir el tropismo viral. En otras palabras, podemos trazar un mapa de las células susceptibles de ser infectadas por el virus en función de la composición de los receptores y los proteoglicanos. Este mapa teórico nos ayuda ahora a (i) engendrar una interacción multivalente similar para atacar exclusivamente el virus y, (ii) mapear el tropismo del virus y, por tanto, dirigirlo específicamente al tejido infectado.

## **EXPLICACIÓN DE LOS GASTOS**

En el caso del proyecto 2 “Liberación de nanofármacos como terapia para la COVID-19”, con esta iniciativa se han conseguido recaudar un total de 11.188,22 € que se ejecutaron durante los 12 meses iniciales. La totalidad del presupuesto se ha destinado a la compra de material fungible de laboratorio necesario para llevar a cabo los experimentos de identificación y estudio de receptores relevantes para la infección del virus en células humanas, así como la fabricación de los nanofármacos y su evaluación *in vitro*.

En paralelo a este proyecto, el Prof. Battaglia ha presentado varias propuestas a convocatorias públicas competitivas, como son *Convocatoria Urgente De Expresiones De Interés Para La Financiación Extraordinaria De Proyectos De Investigación Sobre El Sars-Cov-2 Y La*

*Enfermedad Covid-19*, del Instituto de Salud Carlos III, *La Marató de TV3 2021* dedicada a COVID-19, y *CaixaImpulse Express Call on COVID-19* de la Fundación La Caixa, actualmente, cuenta con una estudiante de doctorado trabajando en este tema, con la finalidad de continuar y consolidar esta línea de investigación. A pesar de no haber conseguido financiación a través de estos programas, se ha podido establecer una colaboración clave con el Prof. Raffaele di Francesco, jefe del departamento de Virología del “Istituto Nazionale di Genetica Molecolare-INGM” (Milán, Italia), un experto reconocido por sus importantes contribuciones en el campo de la virología molecular del virus de la hepatitis C y la identificación de nuevas estrategias terapéuticas para la hepatitis B crónica y COVID-19.

## **REFERENCIAS**

### **The Role of Host Cell Glycans on Virus Infectivity: The SARS-CoV-2 Case**

Silvia Acosta-Gutiérrez, Joseph Buckley, and **Giuseppe Battaglia**. Adv. Sci. 2022, 220185.  
Doi: [doi.org/10.1002/advs.202201853](https://doi.org/10.1002/advs.202201853)

**The Role of Glycocalyx Steric Effects on Viral Endocytosis** Joseph Buckley and **Giuseppe Battaglia** bioRxiv 2022 doi: [doi.org/10.1101/2022.02.12.480189](https://doi.org/10.1101/2022.02.12.480189)

## **PROYECTO 3:** Estudio de las secuelas musculares en pacientes que han superado la enfermedad COVID19

### **1. Introducción**

La fatiga es uno de los síntomas más comunes (44-70 %) en las personas infectadas por SARS-CoV-2. Puede implicar intolerancia al ejercicio y perturbar las actividades mentales al ralentizar el curso del pensamiento y olvidar eventos recientes. Después del episodio agudo, la fatiga puede persistir y volverse crónica. Un subgrupo de pacientes mantuvo estos síntomas más de 3 meses después de la infección por COVID-19. Se les llama pacientes con síndrome Post-COVID-19 o "Long-haulers", y el 20% de los pacientes desarrollan este síndrome. El síndrome post-COVID-19 provoca un marcado deterioro del estado general del paciente, incluyendo la actividad física y cognitiva global y, consecuentemente, la calidad de vida. Estos pacientes presentan intolerancia física al mínimo esfuerzo, no pueden realizar actividades mentales complejas o continuas y se distraen fácilmente. La presencia de disautonomía implica la desregulación del equilibrio corporal, la posición corporal, la temperatura corporal, la presión arterial o la frecuencia cardíaca. Estos pacientes muchas veces no pueden mantener sus actividades personales o laborales. Debido a esta discapacidad social, se han agrupado en asociaciones y han solicitado atención sanitaria específica. Se desconoce la causa del síndrome Post-COVID-19. Puede considerarse síndrome de fatiga posviral. En personas genéticamente predispuestas, tras el contacto con el SARS-CoV-2, el cerebro mantendría un estado inflamatorio crónico de bajo grado que desregula muchas funciones y genera síntomas multisistémicos como fatiga e intolerancia ortostática como expresión de sensibilización cerebral. Proponemos realizar un estudio científico entre el Hospital Clínic de Barcelona y el IBEC para evaluar el síndrome Post-COVID-19. Exploraremos los mecanismos alterados y si son responsables de la persistencia de la enfermedad. Realizaremos estudios comparativos entre pacientes con fatiga crónica Post-COVID-19 +/- con controles sin COVID-19. Exploraremos los mecanismos que pueden justificar estas alteraciones, como la generación de energía celular, la expresión de la inflamación en la infección viral con análisis de sangre y estudios inmunológicos. Se expondrá un modelo organoide de músculo esquelético 3D experimental al suero del paciente para detectar cambios específicos. Nuestro objetivo es encontrar dianas que permitan la detección precoz de pacientes con síndrome Post-COVID-19 y mejorar la sintomatología de quienes ya padecen este síndrome.

### **2. Hipótesis y objetivos del proyecto.**

Después de superar el COVID-19, un porcentaje significativo de pacientes experimentará síntomas que generalmente se resuelven en 3 semanas, mientras que otros desarrollan síntomas persistentes comunes. Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios epidemiológicos de seguimiento que examinen la prevalencia, los factores de riesgo y se desconocen los mecanismos patogénicos inmunológicos y moleculares subyacentes del síndrome pos-COVID-19. La identificación de brechas cruciales en la investigación sobre los síntomas potencialmente devastadores y duraderos de la infección por SARS-CoV-2 en los resultados de salud debe abordarse con urgencia para encontrar terapias personalizadas.

HIPOTIZAMOS que:

1- Casi el 20% de los sujetos con infección aguda por COVID-19 desarrollarán el síndrome Post-COVID-19.

2- La fatiga será un síntoma relevante en el síndrome Post-COVID-19, afectando hasta al 80% de los sujetos, con importantes repercusiones en la calidad de vida relacionada con la salud y la carga económica.

3- La intolerancia al ejercicio físico será prevalente en pacientes con síndrome Post-COVID-19.

4- En la mayoría de las personas con síndrome Post-COVID-19, la fatiga cumple con los criterios diagnósticos de Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis Miálgica (2011 ICC).

6- La base patogénica del síndrome Post-COVID-19 subyace en la respuesta sistémica neuroinmunológica e inflamatoria, que conduce a la disrupción bioenergética mitocondrial y cambios en las células fenotípicas del exosoma y alteración de la respuesta biológica implicada en la disfunción autonómica.

7- Los organoides musculares pueden ayudar a estudiar después del tratamiento con biofluidos post-COVID-19, la contractilidad muscular, la secreción de mioquinas solubles y el análisis metabólico.

#### Objetivos del proyecto:

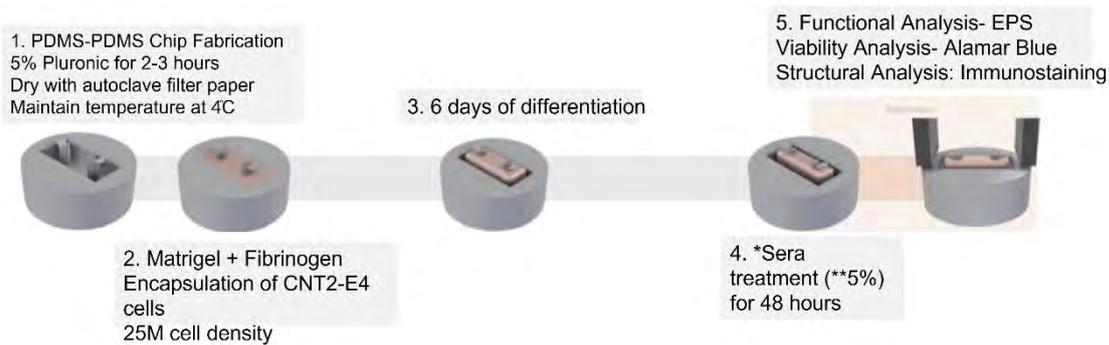
Estudiar las características funcionales y estructurales de los tejidos musculares tridimensionales in vitro tratados con sueros de pacientes con fatiga crónica:

- 1- Para diseñar músculos esqueléticos 3-D in vitro.
- 2- Tratarlos con sueros de pacientes con fatiga crónica.
- 3- Análisis funcional mediante EPS (cálculo de fuerzas).
- 4- Análisis estructural mediante inmunotinción.
- 5- Análisis de actividad mitocondrial.

### **3. Resultados y discusión**

#### **Músculo esquelético 3D funcional**

El Músculo en Chip (MoC) como modelo organoide permite un estudio más personalizado de la mialgia en los supervivientes de COVID-19. Esta plataforma, ya desarrollada, consta de un biorreactor que reproduce el entorno microfisiológico del músculo y permite su estimulación eléctrica. Este biorreactor integra cultivos musculares 3D desarrollados a partir de células humanas de control, cultivándolas en andamios de biomaterial electroconductor y aplicando diferentes regímenes de estimulación eléctrica a través de electrodos integrados (**Figura 1**). El equipo del IBEC ha desarrollado músculo esquelético en 3D mediante bioingeniería a partir de células satélite derivadas de pacientes. Estos músculos in vitro expresan marcadores musculares maduros y responden a la estimulación por pulsos eléctricos (EPS).



**Figura 1. Fabricación muscular y tratamiento con suero de pacientes.**

Las plataformas individuales se diseñaron como chips circulares que encajan dentro de placas de 48 pocillos. Cada plataforma tiene un pozo de vaciado rectangular con una capacidad volumétrica de 35  $\mu\text{L}$  y contiene un par de postes que dirigen la formación de tejido. Fundamentalmente, para garantizar que los tejidos se mantengan bajo tensión, diseñamos características similares a ganchos en la parte superior de cada poste.

El efecto sobre la maduración del tejido creado mediante bioingeniería se ha analizado mediante microscopía confocal después de teñir marcadores de músculo esquelético. Además, se ha caracterizado la respuesta fisiológica de los tejidos 3D estudiando el efecto de los sueros sobre la dinámica de contracción y la fuerza que ejercen los tejidos sobre los pilares del PDMS tras el EPS.

La formación eficiente de miotubos en los tejidos del músculo esquelético modificado requiere señales topográficas y microambientales adecuadas que favorezcan la alineación y la fusión celular. Cuando los “andamios” están hechos de biomateriales compactables, como colágeno, matrices EHS o fibrina, el enfoque de fabricación más común consiste en introducir puntos de unión similares a tendones para proporcionar tensión uniaxial durante la remodelación de la MEC1<sup>1</sup>. Siguiendo esta estrategia, los hidrogeles fibrin-Matrigel® y fibrin-Geltrex™ se han vaciado en moldes de silicona con marcos de nailon o ganchos como puntos de anclaje<sup>2-5</sup>. Los haces de tejido muscular resultantes debían manipularse y transferirse a una plataforma diferente para la estimulación y las mediciones de fuerza. Otro método ampliamente utilizado consiste en la compactación de la matriz cargada de células alrededor de un par de postes de silicona flexibles<sup>6,7</sup>. Además de proporcionar tensión uniaxial, estos sistemas de yeso de hidrogel permiten el seguimiento in situ de la desviación del poste debido a la contracción del tejido. Además, estas desviaciones se pueden transformar en medidas de fuerza. Teniendo en cuenta estas ventajas, fabricamos plataformas de yeso de hidrogel que contenían dos postes flexibles como puntos de anclaje (**Figura 1**). Las plataformas PDMS finales se fabricaron mediante el moldeado de réplicas de moldes maestros impresos en 3D, utilizando Ecoflex™ como moldes negativos intermediarios reutilizables. Ecoflex™ es una silicona catalizada con platino, que se cura a temperatura ambiente, lo que da como resultado un material muy elástico que se puede aplicar como un molde elástico totalmente deformable<sup>8</sup>. Las plataformas individuales se diseñaron como chips circulares que encajan dentro de placas de 48 pocillos. Cada plataforma tiene un pozo de vaciado rectangular con una capacidad volumétrica de 35  $\mu\text{L}$  y contiene un par de postes que dirigen la formación de tejido. Fundamentalmente, para garantizar que los tejidos se mantengan bajo tensión, diseñamos características similares a ganchos en la parte superior de cada poste.

El efecto sobre la maduración del tejido creado mediante bioingeniería se ha analizado mediante microscopía confocal después de teñir marcadores de músculo esquelético. Además, se ha caracterizado la respuesta fisiológica de los tejidos 3D estudiando el efecto de los sueros sobre la dinámica de contracción y la fuerza que ejercen los tejidos sobre los pilares del PDMS tras el EPS.

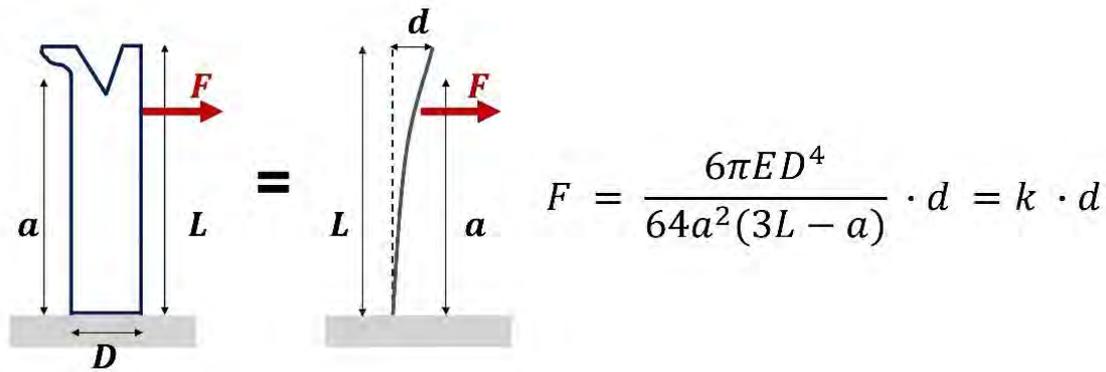
## Tratamiento con Suero/plasma de pacientes y análisis de fuerza

**Tabla 1.** Lista de muestras de Suero

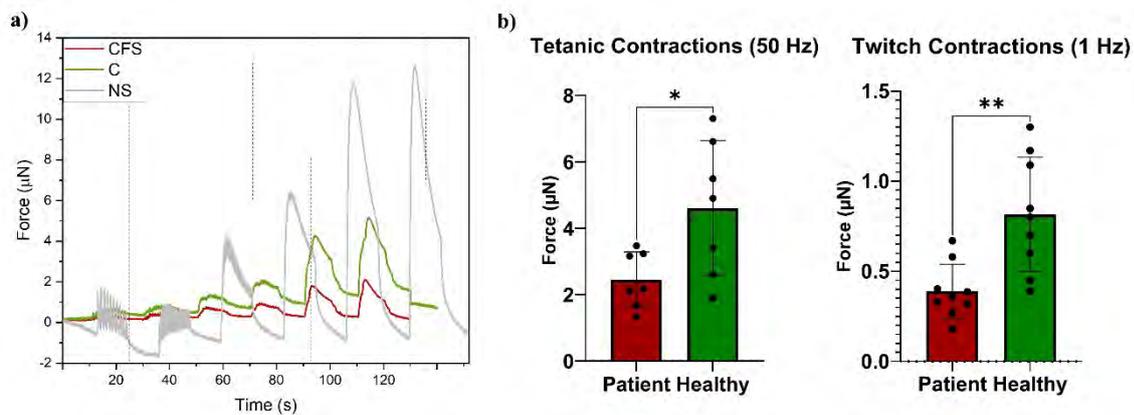
Código de muestra	Grupos	Origen	Tipo
CSF-01	paciente	Hospital Clinic	Suero
CSF-02	paciente	Hospital Clinic	Suero
CSF-03	paciente	Hospital Clinic	Suero
CSF-04	paciente	Hospital Clinic	Suero
CSF-05	paciente	Hospital Clinic	Suero
LV-001SUB	paciente	Vall de Hebrón	Suero
LV-005SUB	paciente	Vall de Hebrón	Suero
LV-018SUB	paciente	Vall de Hebrón	Suero
LV-037SUB	paciente	Vall de Hebrón	Suero
LV-048SUB	paciente	Vall de Hebrón	Suero
C-01	control	Hospital Clinic	Suero
C-02	control	Hospital Clinic	Suero
C-03	control	Hospital Clinic	Suero
C-04	control	Hospital Clinic	Suero
C-05	control	Hospital Clinic	Suero
HC-02	control	Vall de Hebrón	Suero
HC-03	control	Vall de Hebrón	Suero
HC-04	control	Vall de Hebrón	Suero
HC-05	control	Vall de Hebrón	Suero
HC-06	control	Vall de Hebrón	Suero
LV-001	paciente	Vall de Hebrón	Plasma
LV-018	paciente	Vall de Hebrón	Plasma
LV-042	paciente	Vall de Hebrón	Plasma

Las desviaciones posteriores durante las contracciones del tejido se registraron y analizaron utilizando Fiji. La relación fuerza-desplazamiento de los postes se estimó utilizando la teoría de flexión lineal basada en protocolos publicados previamente (**Figura 2**)<sup>9,10</sup>. El módulo de Young del PDMS (10:1) se midió previamente como  $1,6 \pm 0,1$  MPa. Teniendo en cuenta la geometría y las dimensiones de los postes, calculamos una constante de resorte (k) de 3,54 N/m. La constante de resorte se usó para transformar las desviaciones posteriores registradas (d) en la fuerza generada por los tejidos del músculo esquelético 3D de bioingeniería (F).

Los músculos 3D se trataron después de 6 días de diferenciación tisular durante 48 horas con una concentración de suero/plasma del 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 y 5% (lista de sueros/plasma en la **Tabla 1**). Después del tratamiento, los tejidos fueron estimulados a diferentes frecuencias. Los mejores resultados se obtuvieron con 5% de suero/plasma, y los resultados mostrados en los siguientes resultados corresponden a un 5% de concentración de suero/plasma.



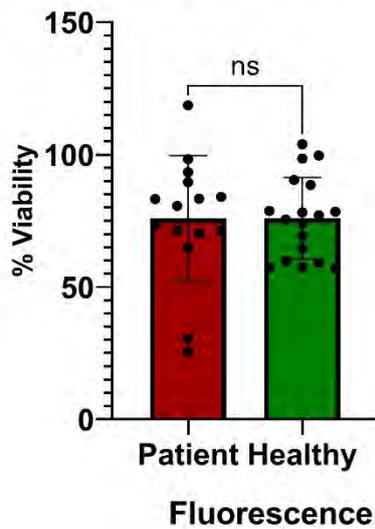
**Figura 2. Caracterización de las propiedades post-mecánicas.** La fuerza ejercida por el músculo esquelético está calculada desde la geometría y mecánica post geometría. Diámetro ( $D$ ), longitud total ( $L$ ), longitud desde el suelo del poste hasta el centro del tapón ( $a$ ), deflexión ( $d$ ), y el módulo de Young del PDMS ( $E$ ).



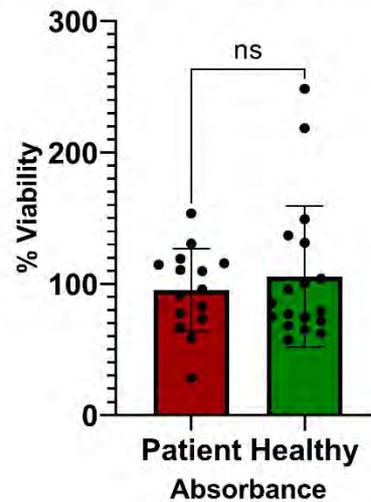
**Figura 3.** a) mediana del análisis de la fuerza de contracción de los músculos 3D: CFS, paciente sueros. C, control. NS, no tratado. b) Comparación de la fuerza de contracción en µN de miotubos diferenciados tratados con sueros de pacientes y sueros de control a 50 Hz (contracción tetánica) y 1 Hz (contracción twitch). Todos los datos del grupo se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el software Prism 8 (GraphPad) mediante una prueba t de Student ( $\alpha = 0,05$ ), aplicando la corrección de Welch cuando fue necesario. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$

Como se muestra en la **Figura 3**, existe un claro efecto sobre la contracción muscular de los tejidos 3D tratados con sueros de paciente o controles. El patrón de la fuerza de contracción indica Sin tratar > Sueros sanos > Sueros del paciente con SFC. Los sueros de pacientes afectados por fatiga crónica alteran la funcionalidad del músculo esquelético, pero este efecto no está afectando la viabilidad, como se puede observar en la **Figura 4**.

### Alamar Blue 3-D Encapsulations



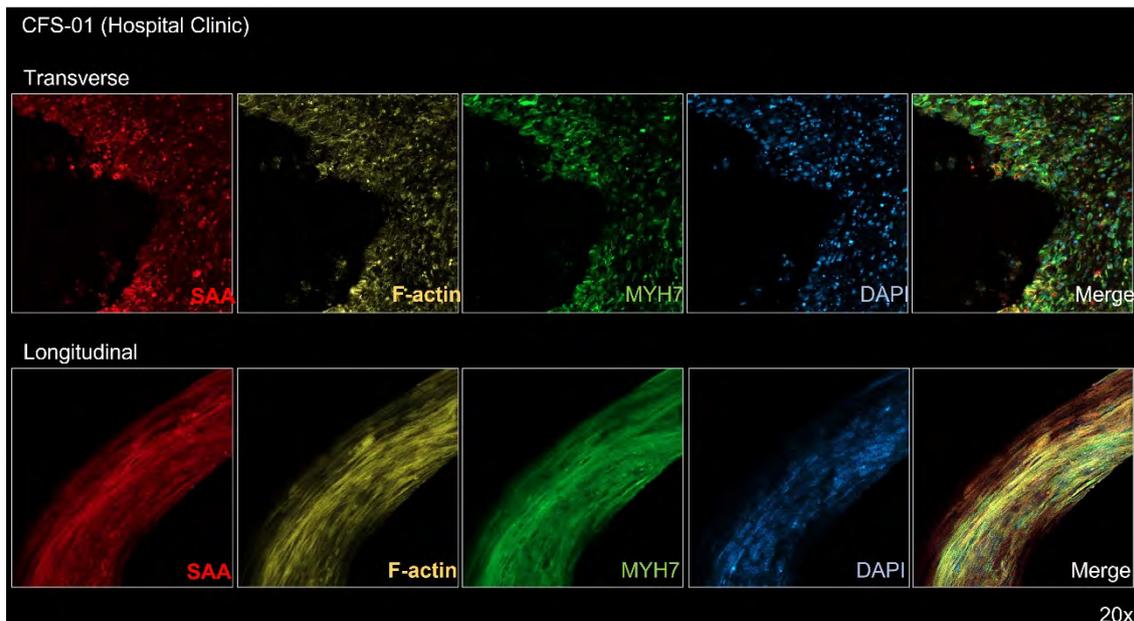
### Alamar Blue 3-D Encapsulations



**Figura 4.** Actividad metabólica de las células de músculo esquelético encapsuladas tratadas con suero. No se ha observado diferencias significativas entre ambos grupos de tejidos tratados.

Las mediciones en todos estos casos se realizaron manualmente, utilizando herramientas del software ImageJ. Por el contrario, nuestros protocolos se obtendrán mediante una reconstrucción 3D utilizando el software Imaris. Con esta reconstrucción, cada diámetro de miotubo se obtendrá automáticamente con herramientas de análisis de superficie. Estos datos darán una idea de la posibilidad de atrofia en los tejidos.

Después del tratamiento, las muestras se fijaron y los tejidos musculares creados mediante bioingeniería se tiñeron para detectar  $\alpha$ -actinina sarcomérica (SAA, verde), F-actina (roja) y núcleos (azul) (**Figura 5**). Las imágenes confocales mostraron miotubos multinucleados largos, altamente alineados, que expresaban SAA. Nuestro siguiente paso es analizar el tamaño y diámetro de los miotubos. Las reconstrucciones 3D de miotubos que expresan SAA se utilizarán para medir el diámetro individual de los miotubos de control y tratados a lo largo del tiempo. Varios trabajos han cuantificado el diámetro de los miotubos en 2D para diferentes propósitos; por ejemplo, para caracterizar células de pacientes <sup>11</sup>, probar diferentes condiciones de cultivo <sup>12</sup>, evaluar la influencia de la topografía en la diferenciación <sup>13</sup>, o estudiar el efecto de administrar un determinado compuesto a los miotubos <sup>14</sup>. El diámetro de los miotubos también se ha medido en cultivos 3D; por ejemplo, Khodabukus et al. compararon secciones transversales de miotubos para analizar la maduración de construcciones estimuladas eléctricamente <sup>4</sup>. Las mediciones en todos estos casos se realizaron manualmente, utilizando herramientas del software ImageJ. Por el contrario, nuestros protocolos se obtendrán mediante una reconstrucción 3D utilizando el software Imaris. Con esta reconstrucción, cada diámetro de miotubo se obtendrá automáticamente con herramientas de análisis de superficie. Estos datos darán una idea de la posibilidad de atrofia en los tejidos.



**Figura 5.** Imágenes representativas de microscopía confocal de cultivos 3D teñidos con la cadena de miosina pesada 7 (MYH7, verde),  $\alpha$ -actinina sarcomérica (SAA, rojo), actina (F-actina, amarillo), and núcleos (DAPI, azul) tras 48 horas de tratamiento con suero CFS-01.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Los sueros de diferentes donantes exhiben diferentes respuestas. Respuesta media considerada.
- El patrón de la fuerza de contracción indica Sin tratar > Sueros sanos > Sueros del paciente con SFC.
- La diferencia en actividad/viabilidad metabólica entre muestras tratadas con sueros sanos y pacientes no es significativa.
- Los sueros de pacientes de ambos hospitales muestran la misma respuesta.

Los próximos pasos serán:

Analizaremos el diámetro y tamaño de los miotubos. Esto puede abrir nuevas hipótesis para explicar el mecanismo de la enfermedad. El tratamiento de los sueros recogidos de los pacientes puede provocar un deterioro de la masa y la función de los miotubos 3D. En trabajos anteriores hemos demostrado que un hígado no funcional puede producir pérdida de citoplasma, reducción de la actividad metabólica y del diámetro de los miotubos, características todas ellas asociadas a la pérdida de diferenciación. Aquí, no hemos visto una reducción en la viabilidad sino una reducción en la funcionalidad. Si demostramos una reducción en el tamaño y el diámetro, continuaremos con el análisis de genes. A nivel de génico, analizaremos la expresión de marcadores de diferenciación de miotubos y atrofia si están desregulados. Particularmente, por ejemplo, la sobreexpresión de MyoG y la subexpresión de Tnnt1, la primera involucrada en los primeros pasos mientras que la segunda en las últimas etapas de la diferenciación de miotubos.

Investigaremos más a fondo el mecanismo detrás de la pérdida de citoplasma, evaluando el nivel de genes involucrados en la atrofia. Específicamente, los altos niveles de Foxo3 y Fbx32 demostraron la reducción del tamaño y la función de los microtubos. Con la ayuda del Hospital Clínic analizaremos la actividad mitocondrial de los microtubos y el número, tamaño y distribución de las mitocondrias.

En conclusión, tenemos dos hipótesis, atrofia o actividad de reducción de mitocondrias, que analizaremos en los próximos pasos.

### **RESUMEN DIVULGATIVO**

Diversos estudios sugieren que hasta un 10-15 % de todos los pacientes con COVID-19 pueden presentar síntomas persistentes semanas o incluso meses después de la infección inicial. Mientras los investigadores intentan buscar paralelismos con otros brotes de coronavirus anteriores (SARS-CoV-1 de 2003 y MERS-CoV de 2012), actualmente se desconoce el panorama completo de las consecuencias a largo plazo de la infección por COVID-19. Desde el comienzo de la pandemia de COVID-19, la fatiga es uno de los síntomas más comunes (44-70 %) en las personas infectadas por SARS-CoV-2. Después del episodio agudo, la fatiga puede persistir y volverse crónica. Un subgrupo de pacientes mantuvo estos síntomas más de 3 meses después de la infección por COVID-19. Se les llama pacientes con síndrome Post-COVID-19 o "Long-haulers", y el 20% de los pacientes desarrollan este síndrome. El síndrome post-COVID-19 provoca un marcado deterioro del estado general del paciente, incluyendo la actividad física y cognitiva global y, consecuentemente, la calidad de vida. Estos pacientes presentan intolerancia física al mínimo esfuerzo, no pueden realizar actividades mentales complejas o continuas y se distraen fácilmente. Estos pacientes muchas veces no pueden mantener sus actividades personales o laborales. No se conocen las causas, pero en personas genéticamente predispuestas, tras el contacto con el SARS-CoV-2, el cerebro mantendría un estado inflamatorio crónico de bajo grado que desregula muchas funciones y genera síntomas multisistémicos como fatiga e intolerancia ortostática como expresión de sensibilización cerebral.

En el IBEC hemos combinado la ingeniería de tejidos y muestras de pacientes del Hospital Clínic y el Hospital de la Vall de Hebrón de Barcelona, para crear un modelo de músculo humano que nos permite el estudio de la fatiga persistente en pacientes con síndrome Post-COVID-19. Hemos desarrollado tejido muscular humano a partir de células precursoras y lo hemos introducido en un dispositivo que nos permite monitorizar la contracción del tejido y calcular las fuerzas que ejerce el músculo al contraerse. Por otro lado, hemos recolectado, con la ayuda de los hospitales, una librería de muestras de suero de pacientes que han padecido la infección y sufren fatiga crónica, y de muestras control de personas sanas. Al tratar los músculos con estos sueros durante 48 horas hemos observado un patrón claro de disminución de fuerza en los tejidos musculares. Esto nos indica claramente que hay un componente en los sueros de los pacientes con fatiga crónica persistente que afecta a la funcionalidad del músculo esquelético. Ahora el trabajo se va a centrar en averiguar cuál es el motivo de esta pérdida de funcionalidad y nos enfocaremos en estudiar más a fondo el músculo después de su tratamiento con los sueros de los pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Vandenburgh, H. *et al.* Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve* **37**, 438–447 (2008).
2. Madden, L., Juhas, M., Kraus, W. E., Truskey, G. A. & Bursac, N. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *Elife* **2015**, 1–14 (2015).
3. Rao, L., Qian, Y., Khodabukus, A., Ribar, T. & Bursac, N. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat. Commun.* **9**, 126 (2018).
4. Khodabukus, A. *et al.* Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. *Biomaterials* **198**, 259–269 (2019).
5. Afshar Bakooshi, M. *et al.* A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *Elife* **8**, e44530 (2019).
6. Mestre, R. *et al.* Force Modulation and Adaptability of 3D-Bioprinted Biological Actuators Based on Skeletal Muscle Tissue. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1800631 (2019).
7. Christensen, R. K., von Halling Laier, C., Kiziltay, A., Wilson, S. & Larsen, N. B. 3D Printed Hydrogel Multiassay Platforms for Robust Generation of Engineered Contractile Tissues. *Biomacromolecules* **21**, 356–365 (2020).
8. Badilita, V. *et al.* Microscale nuclear magnetic resonance: a tool for soft matter research. *Soft Matter* **8**, 10583–10597 (2012).
9. Kalman, B., Picart, C. & Boudou, T. Quick and easy microfabrication of T-shaped cantilevers to generate arrays of microtissues. *Biomed. Microdevices* **18**, (2016).
10. Ramade, A., Legant, W. R., Picart, C., Chen, C. S. & Boudou, T. Microfabrication of a Platform to Measure and Manipulate the Mechanics of Engineered Microtissues. in *Methods in Cell Biology* vol. 121 191–211 (Elsevier Inc., 2014).
11. Pomiès, P. *et al.* Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 175–186 (2015).
12. Archer-Lahlou, E., Lan, C. & Jagoe, R. T. Physiological culture conditions alter myotube morphology and responses to atrophy treatments: implications for in vitro research on muscle wasting. *Physiol. Rep.* **6**, e13726 (2018).
13. Almonacid Suarez, A. M., Zhou, Q., van Rijn, P. & Harmsen, M. C. Directional topography gradients drive optimum alignment and differentiation of human myoblasts. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 2234–2245 (2019).
14. Ohno, Y. *et al.* Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiol. (Oxf)*. **223**, e13042 (2018).

## **EXPLICACIÓN DE LOS GASTOS**

En la campaña Faster Future “A por la COVID-19”, iniciada por el IBEC, el grupo del Dr. Ramón ha contado con 10.116,65€ para la ejecución del proyecto descrito en este informe, los cuales se han ejecutado en sus totalidad durante los 18 meses de vigencia. Los fondos se han destinados a la compra de reactivos necesarios (medios celulares, kits, material plástico, entre otros) para los cultivos musculares 3D para el estudio de las secuelas musculares y el posterior análisis de la fuerza. Paralelo a los fondos de la campaña de mecenazgo, el Dr. Ramón ha presentado varias propuestas a convocatorias competitivas de la Comisión Europea, así como la Agencia Catalana de Investigación y Universidades, para ampliar el estudio de las secuelas musculares en pacientes que hayan superado la enfermedad COVID-19 y, actualmente, cuenta

con una estudiante de doctorado trabajando en este tema. Aunque lamentablemente estas propuestas no han sido financiadas, la preparación de las mismas ha servido para el establecimiento de una red de colaboradores internacionales, entre los cuales se incluyen hospitales que han tenido pacientes COVID-19 en España (Hospital Clínic Barcelona y Hospital Vall d'Hebron), Italia (Azienda Ospedale-Universita Padova) o Rumanía (Saint John Emergency Clinical Hospital).

## Informe sobre la difusión e impacto sobre los medios de comunicación del artículo:

### **A diabetic milieu increases ACE2 expression and cellular susceptibility to SARS-CoV-2 infections in human kidney organoids and patient cells**

Elena Garreta, Patricia Prado, Megan L. Stanifer, Vanessa Monteil, Andrés Marco, Asier Ullate-Agote, Daniel Moya-Rull, Amaia Vilas-Zornoza, Carolina Tarantino, Juan Pablo Romero, Gustav Jonsson, Roger Oria, Alexandra Leopoldi, Astrid Hagelkruys, Maria Gallo, Federico González, Pere Domingo-Pedrol, Aleix Gavaldà, Carmen Hurtado del Pozo, Omar Hasan Ali, Pedro Ventura-Aguiar, Josep María Campistol, Felipe Prosper, Ali Mirazimi, Steeve Boulant, Josef M. Penninger, **Nuria Montserrat**. *Cell Metabolism*, 34(6), 857-873.e9 - May 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.04.009>

Cabe destacar que el artículo de la revista *Cell Metabolism* generó un total de 41 impactos en los medios nacionales, valorado en un total de 133.000€ y alcanzó una audiencia de casi 12.000.000 de personas (detalles en los documentos a continuación).

## 1. Prensa

Medio	Procedencia	Lectores	Tirada	Periodicidad	Clasificación	Titular	Fecha	Página	Num. Páginas
Gaceta Médica	MADRID	56888	14227	Semanal (Lunes)	Revistas	EL ESTUDIO CON 'MINIRRIÑONES' DEL IBEC PRUEBA LA RELACIÓN ENTRE DIABETES Y COVID	16/05/22	13	1
Ara	CATALUNYA	78000	18416	Diaria	Información General	LES CARES DEL DIA	14/05/22	3	1
Ara	CATALUNYA	78000	18416	Diaria	Información General	EL MISTERIÓS CAS DEL RONYÓ QUE DEIXAVA ENTRAR EL COVID	14/05/22	33	1
El Mundo	MADRID	447000	68311	Diaria	Información General	LA DIABETES ABRE AL COVID MÁS 'PUERTAS'	13/05/22	19	1
La Voz de Galicia	GALICIA	323000	57264	Diaria	Información General	CREAN MINIÓRGANOS EN LABORATORIO QUE SIMULAN LA FUNCIÓN DE UN RIÑÓN DIABÉTICO	13/05/22	25	1

## 2. Televisión

Fecha	Medio	Titular	Hora Inicio	Duración	Audiencia	Valoración
12/05/22	TELEVISIO DE CATALUNYA / TOT ES MOU	#SOCIEDAD. CIENTIFICOS DEL INSTITUTO DE BIOINGENIERIA DE CATALUÑA HAN DESARROLLADO UNOS MINI RIÑONES HUMAN EN UN LABORATORIO QUE SIMULAN LOS DE UN DIABETICO EN LA PRIMERA FASE DE LA ENFERMEDAD.	20:04	00:00:51	99000	10200

### 3. Internet

Fecha	Medio	Titular	Tipología	Audiencia diaria	Audiencia mensual	Valoración
16/05/22	ISanidad	Investigadores crean mini-riñones que ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de Covid-19	Online	6157	48705	37.04
16/05/22	JANO.es	Miniriñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de desarrollar COVID-19 grave	Online	1000	18002	30
13/05/22	Ara Balears	Imatge combinada d'un organoide de ronyó creat al laboratori per l'equip de Núria Montserrat.	Online	5336	109257	30
13/05/22	Ara Cat	El misteriós cas del ronyó que deixava entrar el covid	Online	73502	892299	551.27
13/05/22	RunRun.es	#ReporteCoronavirus   Las 7 noticias más importantes de la mañana #13May	Online	33254	351764	91.78
13/05/22	consalud.es	Mini-riñones de laboratorio ayudan a entender por qué los diabéticos tienen más riesgo de Covid	Online	27918	536133	230.94
13/05/22	IM Médico Hospitalario	Mini-riñones generados en laboratorio arrojan luz sobre la conexión entre la diabetes y el Covid-19	Online	1000	10578	30
13/05/22	ElSiglo.com.ve	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	16422	173714	49.27
12/05/22	El Universal Colombia	Riñones creados en laboratorio demuestran mayor riesgo de COVID-19	Online	68938	36142	310.22
12/05/22	Gaceta Medica.com	El estudio con 'miniriñones' demuestra la relación entre la diabetes y la COVID-19	Online	11496	85449	86.45
12/05/22	Cronica de Cantabria	Mini-riñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de COVID	Online	1000	10578	30
12/05/22	Diario Rotativo	Unos miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran un mayor riesgo a la infección por covid	Online	17653	186735	100.62
12/05/22	Yahoo! España	Unos miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran un mayor riesgo a la infección por covid	Online	526647	5570925	2317.24
12/05/22	Yahoo! Deportes	Unos miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran un mayor riesgo a la infección por covid	Online	1000	10578	30
12/05/22	EFE	CORONAVIRUS DIABETES - Unos miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran un mayor riesgo a la infección por covid	Online	272141	548286	1469.56
12/05/22	EFE Servicios	Unos miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran un mayor riesgo a la infección por covid	Online	126976	1343165	2323.67
12/05/22	La Voz de Asturias	Crean miniriñones que simulan el funcionamiento de un riñón con diabetes	Online	86215	621729	672.47
12/05/22	NoticiasDe.es	Mini-riñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de COVID	Online	4105	43423	30
12/05/22	Medical Xpress	Laboratory-generated mini-kidneys help uncover the link between diabetes and COVID-19 disease	Online	119059	1259418	607.19
12/05/22	SIGLO XXI	Mini-riñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de COVID	Online	25863	37253	186.21
12/05/22	ViralTV.es	Miniriñones humanos con diabetes confirman la mayor susceptibilidad al Covid-19 de los diabéticos	Online	1000	10578	30
12/05/22	Infosalus	Mini-riñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de COVID	Online	60930	1382109	504
12/05/22	Noticias de Navarra	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	132690	1736481	1433.05
12/05/22	EL ESPAÑOL	Hito español contra la Covid-19: hallado el punto débil de los diabéticos frente a la infección	Online	1125037	19040969	5703.93
12/05/22	www.infosalus.com / Investigación	Mini-riñones generados en laboratorio ayudan a comprender por qué los pacientes con diabetes tienen más riesgo de COVID	Blogs	64828	685757	213.93
12/05/22	ABC.es Sevilla	Miniriñones humanos con diabetes confirman la mayor susceptibilidad al Covid-19 de los diabéticos	Online	230477	6879266	1313.71
12/05/22	La Vanguardia	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	1782555	19664209	9786.22
12/05/22	Diario ABC	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	102235	82184	613.41
12/05/22	Cope	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	250058	10820971	1050.24
12/05/22	EFE Servicios	Miniriñones diabéticos creados en laboratorio demuestran mayor riesgo covid	Online	126976	1343165	2323.67
12/05/22	EurekAlert!	Laboratory-generated mini-kidneys help understand the link between diabetes and COVID-19 disease	Online	168139	1778591	1614.13
12/05/22	La Voz Digital	Miniriñones humanos con diabetes confirman la mayor susceptibilidad al Covid-19 de los diabéticos	Online	60984	1578599	329.31
12/05/22	La Voz de Galicia	Crean miniriñones que simulan el funcionamiento de un riñón con diabetes	Online	385241	4750617	3051.1
12/05/22	ABC.es	Miniriñones humanos con diabetes confirman la mayor susceptibilidad al Covid-19 de los diabéticos	Online	1573168	15254867	10571.69
12/05/22	El Mundo	Un estudio con mini-riñones generados en laboratorio demuestra que los diabéticos son más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2	Online	3380860	21625480	23327.93