



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



# OPTIMITZACIÓ DEL CULTIU TRIDIMENSIONAL DE MIOBLASTS HUMANS

MARINA ESQUERRÀ PARÉS

TREBALL DE FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

**Tutor acadèmic:** Maria Teresa Blay Olivé, Professora Titular i Investigadora del Grup de Recerca MoBioFood, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, URV.  
mteresa.blay@urv.cat

**En cooperació amb:** *Institute of Bioengineering of Catalonia*

**Supervisor:** Juanma Fernandez Costa, Postdoctoral Researcher, Biosensors for bioengineering, jfernandez@ibecbarcelona.eu

1-09-20

Jo, Marina Esquerrà Parés , amb DNI 49318011P, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) ( <http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

## AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria agrair a l'IBEC, per donar-me la possibilitat de realitzar les pràctiques al seu institut de recerca, en especial al Professor Javier Ramón Azcón líder del grup *Biosensors for bioengineering*. Gràcies per confiar en mi des del primer moment i donar-me l'oportunitat de treballar en el teu equip.

També m'agradaria donar les gràcies al Doctor Juan Manuel Fernández, tutor pràctic d'aquest treball per orientar-me i formar-me durant tota la meva estada, per compartir el teu coneixement dia rere dia, per ensenyar-me com és i com funciona un laboratori de cultius cel·lulars. Per explicar-me totes les tècniques i ajudar-me sempre que ha estat necessari. Així mateix per totes les vegades que m'ha donat l'oportunitat de treballar de fora independent i les vegades que m'ha preguntat la meva opinió i l'ha tingut en compte.

Gràcies a tot l'equip, de *Biosensors for bioengineering* per fer-me sentir des del primer dia un membre més de l'equip, no només en l'àmbit personal sinó també en el professional. Gràcies per ajudar-me i orientar-me durant aquest aprenentatge. De tots vosaltres he après que vol dir treballar en equip i els grans avantatges que comporta treballar en un equip interdisciplinari.

Gràcies a la Doctora Maria Teresa Blay Olivé tutora acadèmica d'aquest treball, per ajudar-me i orientar-me sempre que ho he necessitat.

Per últim voldria donar les gràcies als meus pares per tot el suport que he rebut d'ells en tot moment.

## ABREBIACIONS

|           |  |
|-----------|--|
| CMC       | Metacrilat de carboximetil cel·lulosa  |
| DAPI      | 4',6-diamidino2-fenilindol   |
| DM        | Medi de diferenciació de cèl·lules musculars esquelètiques                           |
| DMEM      | Dulbecco's Modified Eagle Medium   |
| DMPK      | Proteïna quinasa de la distròfia miotònica   |
| DMSO      | Dimethyl sulfoxide   |
| DM1       | Distròfia miotònica tipus 1  |
| EPS       | Estimulació del pols elèctric " <i>Electrical pulse stimulation</i> "                |
| GelMA     | Metacriló de gelatina  |
| GM        | Medi de creixement de cèl·lules musculars esquelètiques                              |
| HMDM      | Medi de diferenciació de mioblasts humans  |
| HS        | Sèrum de cavall  |
| IBEC      | Institut de bioenginyeria de Catalunya   |
| LAP       | Fenil de liti (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfinat                                       |
| NAFLD     | Malaltia de fetge gras no alcohòlic  |
| PBS       | Solució tampó salina amb fosfat  |
| PCR       | Reacció en cadena de la polimerasa   |
| PEGDA     | Diacrilat de polietilè glicol  |
| PDMS      | Polidimetilsiloxana  |
| qPCR      | PCR quantitativa a temps real  |
| rpm       | Revolucions per minut  |
| T         | Temperatura d'hibridació   |
| -sèrum PS | Medi de diferenciació de mioblasts humans -sèrum +Penicilina-streptomicina +Insulina |
| -sèrum G  | Medi de diferenciació de mioblasts humans -sèrum +Gentamicina +Insulina              |
| 2D        | Dues dimensions  |
| 3D        | Tres dimensions  |

## Índex

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Informació sobre el lloc de pràctiques: Institute for Bioengineering of Catalonia IBEC .....</b> | <b>1</b>  |
| Descripció del grup Biosensors per la bioenginyeria.....  | 1         |
| <b>Resum del treball .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Introducció.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Enginyeria de teixits .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Òrgan en un xip.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Projecte de múscul en un xip.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Distròfia miotònica tipus 1 .....</b>  | <b>5</b>  |
| Classificació i Simptomatologia .....   | 6         |
| Tractament de la distròfia miotònica tipus 1 .....  | 7         |
| <b>Hipòtesis de treball i objectiu .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Metodologia .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1. Materials .....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1. Línies cel·lulars .....  | 9         |
| 1.2. Oligonucleòtids .....  | 9         |
| 1.3. Enzims .....   | 10        |
| 1.4. Reactius.....  | 11        |
| 1.5. Kits comercials .....  | 12        |
| 1.6. Medis de cultiu.....   | 12        |
| 1.7. Preparació de la solució de polímer.....   | 13        |
| 1.8. Preparació del PEGDA .....   | 13        |
| 1.9. Programes informàtics.....   | 14        |
| 1.10. Recursos en xarxa .....   | 14        |
| <b>2. Mètodes .....</b>   | <b>14</b> |
| 2.1. Mètodes Moleculars .....   | 14        |
| 2.2. Mètodes cel·lulars.....  | 16        |
| <b>Resultats i discussió .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>Conclusió.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>Autoavaluació.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Bibliografia .....</b>   | <b>36</b> |

## Informació sobre el lloc de pràctiques: *Institute for Bioengineering of Catalonia IBEC*

Les pràctiques les he realitzat a l'IBEC. Aquesta institució deriva del Centre de Referència en Bioenginyeria de Catalunya (CREBEC), creat el 2003 amb l'objectiu de coordinar les activitats de recerca multidisciplinària en enginyeria biomèdica que es duen a terme a Catalunya.

Actualment el centre de recerca té com a objectiu dissenyar i combinar tecnologies innovadores amb les ciències de la vida i la salut. Es tracta d'una institució interdisciplinària que gràcies a aquesta versatilitat es caracteritza, per realitzar estudis complexos i complets en diversos àmbits. Aquest fet fa que l'IBEC sigui reconegut com a centre de recerca d'excel·lència. L'Institut també treballa amb el sector industrial, en aquest cas les recerques tenen com a objectiu dissenyar nous sistemes de tractament i diagnosi de malalties. Tots els projectes de l'Institut representen desafiaments sociopolítics i econòmics. La seva investigació es centra en el diagnòstic precoç i l'estudi de teràpies basades en la medicina regenerativa, però la finalitat de tots els seus estudis és la mateixa, augmentar la qualitat de vida de la societat de forma eficient i sostenible pel sistema sanitari. Des de la seva fundació l'IBEC ha tingut grans èxits reconeguts en els camps de la tecnologia sanitària, medicina regenerativa, la nanomedicina, i en l'àmbit de la ciència i la innovació.<sup>1</sup> L'IBEC té 22 grups de recerca, jo vaig fer les pràctiques al grup de Biosensors per la bioenginyeria.

### Descripció del grup Biosensors per la bioenginyeria

La fase decisiva del descobriment d'un fàrmac, és la fase clínica. En aquesta fase el nou medicament es testa en animals o cèl·lules *in vitro*. Treballar amb animals sempre comporta problemes ètics i extrapolar les dades a condicions humanes és complicat. El problema més greu dels cultius *in vitro*, és recrear les interaccions cèl·lula-cèl·lula i matriu-cèl·lula, ja que sense aquestes interaccions és complicat estudiar el comportament cel·lular. A més a més el mètode actual per testar i desenvolupar nous medicaments es caracteritza per ser car, llarg i amb una freqüència d'èxit molt baixa.

El grup de Biosensors per la bioenginyeria té com a objectiu integrar la tecnologia i la nanotecnologia dels biosensors en l'estudi de l'enginyeria de teixit i cèl·lules mare. Els teixits resultats, són capaços de detectar respostes cel·lulars a estímuls externs, donar suport a diversos requeriments cel·lulars i supervisar la qualitat del microambient calculant la quantitat de metabòlits i nutrients del medi. En el moment en què s'integra biosensors microscòpics a aquests teixits passem a tenir "òrgans en xip". En aquests xips les cèl·lules interactuen entre elles creant teixits funcionals 3D que reproduïxen la biologia i la fisiologia del cos humà. Estudiant la seva microfluídica i utilitzant mètodes analítics simples és possible verificar l'estat de salut del teixit al laboratori durant el procés la fase clínica. Actualment al laboratori dissenyant òrgans en xip per testar fàrmacs per malalties musculars com la distròfia miotònica i malalties metabòliques com la diabetis en el pàncrees i malalties de fetge gras no alcohòlic (NAFLD). Cal remarcar que això només és possible treballant amb un equip interdisciplinari de biòlegs, químics, físics i enginyers.<sup>2</sup>

## Resum del treball

La ciència avança dia rere dia i la bioenginyeria amb ella. Com a científics tenim el deure de cercar mètodes que millorin el sistema que ens envolta. Actualment el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques, es basa en models animals i en cultius de cèl·lules bidimensionals *in vitro*. Però cal tenir en compte que l'ús d'animals simple implica problemes ètics i les estructures bidimensionals no són capaces de reproduir el microambient fisiològic del cos humà.

En aquest treball s'han optimitzat el **cultiu tridimensional** de **mioblasts humans**, amb l'objectiu de sintetitzar a partir de mioblasts de pacients, **teixit muscular diferenciat**, amb una estructura fisiològica comparable a la del múscul humà. Tot això s'ha fet amb la finalitat de crear una nova tècnica que permeti reduir i si és possible eliminar, l'ús d'animals durant la fase preclínica de nous fàrmacs per a la **distròfia miotònica tipus 1**. Aquesta és una malaltia minoritària neuromuscular, d'herència autosòmica dominant, multisistèmica on l'òrgan més afectat és el teixit muscular, que a dia d'avui encara no té cura.

Són moltes les variables que cal tenir en compte per aconseguir un cultiu tridimensional, capaç de reproduir la fisiologia d'un múscul real. Nosaltres hem optimitzat, el material de l'estructura, la forma de l'estructura, la concentració de cèl·lules, el medi de diferenciació i la viabilitat del cultiu. Totes aquestes optimitzacions s'han comprovat mitjançant anàlisis moleculars, morfològics i funcionals.

## Introducció

### Enginyeria de teixits

En els darrers anys ha augmentat l'interès mèdic, acadèmic i social per trobar mètodes que poguessin reproduir la dinàmica del cos humà fora d'aquest. Aquest interès ha fet que creixes exponencialment una branca de la bioenginyeria en els darrers anys, l'enginyeria de teixits. Aquesta modalitat, es basa en l'ús d'eines de diversos camps per a construir substituïts biològics capaços de proporcionar senyals a les poblacions cel·lulars per afavorir la proliferació i la diferenciació cel·lular que imiten els teixits originals amb la finalitat de reimplantar, diagnosticar i investigar. Tot això fa que aquesta disciplina es consideri molt prometedora i potencials per diverses aplicacions clíniques. A dia d'avui hi ha moltes publicacions que mostren els grans avenços en l'enginyeria de teixits com la pell, el cartílag, nervis, fetge, os vàlvules cardíques, vasos sanguinis, bufeta i ronyó. Però aquesta disciplina pot estudiar molts més teixits en profunditat, com el muscular, nosaltres ens centrarem en aquests. L'enginyeria de teixits muscular esquelètic *in vitro*,<sup>3</sup> té com a objectiu, crear un teixit muscular diferenciat i funcional a partir de cèl·lules mare pluripotencials o cèl·lules musculars del pacient. Aquestes cèl·lules es cultiven en ambients prèviament optimitzats i controlats i un cop són madurs s'implanten de nou, en molts altres casos aquests teixits s'asseien a microxips els quals s'utilitzen per a testar fàrmacs que es troben en fase preclínica.<sup>4-5</sup>

### Òrgan en un xip

L'any 2010 Donald Ingber de l'institut Wyss va donar a conèixer la idea d'òrgan en un xip, produint el primer pulmó en xip. Es coneix com a òrgan en un xip la producció d'un sistema de cultiu de cèl·lules que recreen els microambients i els aspectes funcionals clau dels òrgans vius a escala microscòpica. La creació d'aquests xips es basa en l'ús del biomimetisme, la microenginyeria i les tecnologies microfluídiques. La finalitat principal d'aquests sistemes és provar nous fàrmacs de forma fàcil precisa i controlable a la vegada que es redueix l'ús d'animals d'experimentació durant les fases preclíniques de nous fàrmacs. La creació d'aquests microxips confirma que les tecnologies de fabricació a escala microscòpica han aparegut com a eina imprescindible per l'enginyeria de teixits, demostrant que l'estudi de la microfluídica

combinada amb l'enginyeria de teixits i l'ús de biosensors són un enfocament assequible per determinar la resposta dels teixits a estímuls externs.<sup>4</sup>

### Projecte de múscul en un xip

Durant la meua estada he estat treballant en un dels estudis de l'equip de múscul. El projecte es basa en la creació d'un múscul en xip, que s'utilitzaria en la fase clínica, per a testar fàrmacs per a la distròfia miotònica tipus 1. L'objectiu final és dissenyar un xip que sigui capaç de testar diferents fàrmacs en cultius de múscul creats a partir de mioblasts dels propis pacients. Això serà possible gràcies a la interpretació dels resultats que es podran exportar del microxip com per exemple, l'estudi del moviment de contracció, la interacció amb els ions de calci i l'estat metabòlic del cultiu en cada moment.<sup>6</sup>

### Distròfia miotònica tipus 1

La distròfia miotònica tipus 1 (DM1), és una malaltia neuromuscular descrita per primera vegada l'any 1909 pel metge alemany Hans Steinert.<sup>7</sup> Tot i tractar-se d'una malaltia rara és la miopatia més freqüent en adults que pateixen distròfia muscular. La prevalença de DM1 a Europa és de 1/20000 habitants. Es tracta d'una malaltia hereditària autosòmica dominant progressiva i multisistèmica que afecta tots els òrgans del cos, on el teixit muscular és el més afectat.<sup>8</sup> Els malalts també desenvolupen patologies cardiovasculars, cognitives i respiratòries, cosa que fa que la variabilitat fenotípica dels pacients és molt amplia.

La causa genètica d'aquesta malaltia és una mutació dinàmica d'una regió no codificant del gen que codifica per la proteïna quinasa de la distròfia miotònica (DMPK), localitzat al braç llarg del cromosoma 19 (19q13.3).<sup>9</sup> La mutació genera una expansió repetida del trinucleòtid CTG dins els UTR 3' d'aquest gen. Una persona sana té en el gen DMPK menys de 35 repeticions de CTG, menters que el nombre de repeticions dels pacients de DM1 pot variar d'entre 35 a més de 1000. Com major sigui el nombre de repeticions més greu és la malaltia. A més a més és possible que durant la meiosi augmenti el nombre total de repeticions, això fa que si un dels progenitors pateix és portador de la malaltia, la transmeti als seus descendents de forma més agreujant. El causant de la malaltia no és pròpiament l'ADN mutat, sinó el caràcter tòxic de l'ARN transcrit on s'acumulen les repeticions de CUG que s'alineen adoptant

estructura de forqueta de doble cadena. Aquestes estructures queden retingudes en el nucli cel·lular on segregaran proteïnes nuclears com factors de transcripció o d'empalmament. A més a més pot dur a terme el fenomen conegut com a transcripció RAN o traducció no canònica associada a repeticions. Això passa quan la traducció es produeix en totes les pautes de lectura independentment al codó d'inici ATG, fet que dóna la possibilitat de sintetitzar proteïnes tòxiques.

### Classificació i Simptomatologia

El símptoma més comú, és la miotonia, un trastorn neuromuscular caracteritzat per la relaxació muscular lenta després d'una contracció voluntària. Generalment els pacients tenen presenten problemes cardíacs com arrítmies cardíques, causades per defectes de la conducció de les fibres musculars del cor. La segona causa mortal de la DM1 són les morts súbdites causades per aquestes arrítmies, la primera causa és una fallada respiratòria. <sup>8</sup>

Un altre teixit afectat és el sistema nerviós central. Els símptomes neurodegeneratius principals són dèficit cognitiu, trastorns del comportament i excessiva somnolència diürna. A més a més el cervell dels pacients presenta atrofia cortical, lesions en la substància blanca i una reducció del volum total del cerebel.

Els senyals i els símptomes de la DM1 poden ser des de lleus a greus, depenent del nombre de repeticions de CTG.

- D'entre 35 a 49 repeticions CTG es considera premutació. El pacient no presenta símptomes.
- D'entre 50 a 150 repeticions CTG, es coneix com a forma adulta de la malaltia. Pot començar entre els 20 i els 70 anys, l'esperança de vida no es veu alterada, els símptomes més comuns són cataractes i miotonia moderada
- D'entre 100 a 1000 repeticions CTG, es coneix com a forma juvenil. La malaltia comença entre els 10 i els 30 anys, l'esperança de vida es redueix a 48 – 55 anys. Els símptomes són debilitat, miotonia, cataractes, calvície, arítmies al cor i altres símptomes.
- Més de 1000 repeticions, es coneix coma forma congènita. La malaltia afecta comença al moment de néixer o es manifesta abans dels 10 anys. Els infants presenten problemes cognitius greus. Els símptomes són poc to muscular,

problemes per respirar i els símptomes anteriors. L'esperança de vida és de 45 anys.

Com s'ha pogut veure tot i definir-se com una malaltia neuromuscular, presenta un quadre clínic multisistèmic, que afecta pràcticament a tots els òrgans i teixits fent que hi hagi una gran versatilitat en la manifestació dels símptomes.

### Tractament de la distròfia miotònica tipus 1

La DM1 s'ha arribat a considerar una de les malalties amb més variabilitat fenotípica que existeix. Actualment no existeix un tractament pròpiament per aquesta malaltia, sinó que s'utilitzen fàrmacs per intentar tractar les diferents simptomatologies. Actualment són molts els fàrmacs que s'estan estudiant i testant per aquesta malaltia.<sup>10</sup> El principal problema d'aquests medicaments és que són eficients en animals, però tan sols el 10% ho són en humans. Això fa que es creï una necessitat de testar-los directament en humans.

## Hipòtesis de treball i objectiu

### Hipòtesis

És possible sintetitzar un cultiu tridimensional que representi la fisiologia del teixit muscular, a partir de mioblasts de pacients?

### Objectiu general

L'objectiu d'aquest treball és posar a punt el cultiu 3D de mioblast humans, que es disposarà a l'interior del xip.

### Objectius específics

- Optimitzar la composició del material que donarà l'estructura tridimensional del cultiu.
- Optimitzar les condicions del cultiu de mioblasts humans en tres dimensions.
- Optimitzar l'estudi de l'estimulació elèctrica en cultius de mioblasts humans en dues i tres dimensions.
- Optimitzar l'estudi dels ions de calci durant l'estimulació elèctrica en cultius de mioblasts humans en dues i tres dimensions.
- Trobar la viabilitat del cultiu
- Buscar la composició òptima del medi de diferenciació per tal que aquest procés es pugui realitzar amb el màxim d'èxit possible.

## Metodologia

### 1. Materials

#### 1.1. Línies cel·lulars

##### **Mioblasts humans**

En aquest projecte s'ha utilitzat una línia cel·lular comercial de mioblastos humans *Human Skeletal Muscle Cells (SkMC)*, de la casa *PromoCell*. Concretament es van utilitzar els mioblasts criopreservats amb el número de catàleg C-12530 i els mioblasts proliferatius amb el número de catàleg C-12580.

##### **Mioblasts de ratolí**

Per a realitzar la part inicial de l'optimització de l'estimulació elèctrica es van fer servir cèl·lules C2C12 (American Type Culture Collection, CRL-1772). Es tracta d'una línia cel·lular de cèl·lules de mioblast murí immortalitzades originalment subclonades a l'Institut Weizmann de la Ciència d'Israel el 1977

Les dues línies cel·lulars presenten una proliferació ràpida en condicions cèriques altes, mentre que en condicions sèriques altes comencen a diferenciar-se i fusionar-se ràpidament, formant miotubs contràctils.

#### 1.2. Oligonucleòtids

##### 1.2.1. *Encebadors per la retrotranscripció*

Per la transcripció inversa, es van utilitzar hexàmers aleatoris (Roche). Es tracten de seqüències curtes de bases aleatòries generalment [d(N)<sub>6</sub>] que s'utilitzen freqüentment per la síntesi de ADNc mitjançant la transcriptasa inversa amb plantilles d'ARNm. Procedents de la casa *Thermo Fisher* amb el número de catàleg N8080127. En tots els casos la concentració final de cada encebador va ser de 25µL/mL.

##### 1.2.2. *Encebadors per la PCR quantitativa a temps real (qPCR)*

A la taula 1 es mostren, els noms, seqüències i la temperatura d'hibridació (T) de les diferents parelles d'encebadors utilitzats durant les qPCR. En tots els casos la concentració final de cada encebador va ser de 25µL/mL.

| <b>Nom</b> | <b>Sequence (5' →3')</b> | <b>T (°C)</b> |
|------------|--------------------------|---------------|
| GAPDH-f    | GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG   | 65.3          |
| GAPDH-r    | ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA   | 69.9          |
| ACTB-f     | CACCATTGGCAATGAGCGGTTC   | 72.5          |
| ACTB-r     | AGGTCTTTGCGGATGTCCAGT    | 70.9          |
| MYH 1-f    | GCTGGCTAAGACCGAGGCAAAA   | 70.2          |
| MYH 1-r    | CCTTTCCTCTGCATCAGCCAAG   | 69.1          |
| MYH 2-f    | GGAGGACAAAGTCAACACCCTG   | 66.8          |
| MYH 2-r    | GCCCTTTCTAGGTCCATGCGAA   | 70.1          |
| MYH 4-f    | GACAGCCAAGAAGAGGAAACTGG  | 67.1          |
| MYH 4-r    | ACCTGCCATCTCTTCTGTGAGG   | 66.8          |
| MYH 7-f    | GGAGTTCACACGCCTCAAAGAG   | 67.2          |
| MYH 7-r    | TCCTCAGCATCTGCCAGGTTGT   | 70.3          |
| ACTN2-f    | GAGGGCAAGATGGTGTCCGATA   | 69.2          |
| ACTN2-r    | CTTCTCAGCCAGGTGTTCCAAG   | 67.1          |
| TTN-f      | CTGCTGACTACACCTTTGTGGC   | 65.9          |
| TTN-r      | GCTCGCTTCTTCTCCAGTACCT   | 64.9          |
| TTNT 2-f   | AACGCGAACGTCAGGCTAAGCT   | 69.9          |
| TTNT 2-r   | CTTGACCAGGTAGCCGCCAAAA   | 70.9          |
| MYOG -f    | AGTGCCATCCAGTACATCGAGC   | 67.5          |
| MYOG -r    | AGGCGCTGTGAGAGCTGCATTC   | 72.1          |

Taula 1. Encebadors per les qPCR

### 1.3. Enzims

La taula 2, mostra els enzims que es van utilitzar durant tota la investigació, totes elles es van fer servir, seguin les instruccions dels proveïdors i les cases comercials.

| <b>Nom</b>           | <b>Casa comercial</b> | <b>Referència</b> |
|----------------------|-----------------------|-------------------|
| DNasa I              | Invitrogen            | No. 18068-015     |
| <i>RNAseOUT</i>      | Invitrogen            | P/N 100000840     |
| <i>SuperScriptII</i> | Invitrogen            | P/N100004925      |

Taula 2. Enzims

#### 1.4. Reactius

A la taula 3, es mostren tots els reactius que es van utilitzar durant tota la investigació, totes elles es van fer servir, seguin les instruccions dels proveïdors i les cases comercials.

| <b>Nom</b>   | <b>Casa comercial</b> | <b>Referència</b> |
|--|-----------------------|-------------------|
| Blau de tripà  | Invitrogen            | T10282            |
| Col·lagen tipus 1                                    |                       |                   |
| dNTPs  | Roche                 | 11995-065         |
| <i>DTT</i>   | Invitrogen            | P/N 400147        |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM [Piruvat +])  | GIBCO                 | 61965-026         |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-GMAX)         | GIBCO                 |                   |
| Metacriló de gelatina (GelMA)                        | GIBCO                 | 15750-045         |
| Gentamicina  |                       |                   |
| Glutamina  |                       |                   |
| Insulina   | Sigma-Aldrich         | 91077C            |
| Fenil de liti (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfinat (LAP) | TCI EUROPE N.V.       | L0290             |
| 5X First Strand Buffer                               | Invitrogen            | P/Ny02321         |
| Metacrilat de carboximetil cel·lulosa (CMCMA)        |                       |                   |
| <i>M199</i>  | GIBCO                 | 22340-020         |
| <i>Sèrum de cavall (HS)</i>                          | Thermofisher          | 26050088          |
| Solució tampó salina amb fosfat ( <i>PBS</i> )       | Sigma Aldrich         | P4417             |
| Polidimethylsiloxane (PDMS)                          | Dow Corning           | Sylgard 184       |
| <i>Pensisilina-streptomicina</i>                     | Thermofisher          | 15140122          |
| Polidimetilsiloxana ( <i>PEGDA</i> )                 | Polysciencies, Inc    | 15246-10          |
| <i>Tripsina/EDTA</i>                                 | Sigma Aldrich         | T4049             |
| <i>TriReagent</i>                                    | Sigma Aldrich         | T9424             |
| <i>5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)</i>   | Solis Biodyne         | 08-24-00001       |

Taula 3. Reactius

### 1.5. Kits comercials

Els kits utilitzats durant la investigació es mostren a la taula 4, tots es van fer servir, seguint les instruccions dels fabricants.

| Nom                                | Casa comercial           | Referència     |
|------------------------------------|--------------------------|----------------|
| <i>Fluo-4 Calcium Imaging</i>      | Thermo Fisher Scientific | F10489         |
| <i>RNeasy MinElute Cleanup Kit</i> | Qiagen                   | Cat. no. 74204 |

Taula 4. Kits

### 1.6. Medis de cultiu

A la taula 5 es mostren els medis comercials i a la taula 6 els medis preparats al laboratori, tots ells es van fer servir durant la investigació.

| Medis comercials  | Casa comercial   | Referència |
|---|------------------|------------|
| Medi de creixement de cèl·lules musculars esquelètiques (GM)    | <i>PromoCell</i> | C-23060    |
| Medi de diferenciació de cèl·lules musculars esquelètiques (DM) | <i>PromoCell</i> | C-39366    |

Taula 5. Medis de cultiu comercials

| Medis no comercials   | Composició   |
|---|--|
| Medi de diferenciació de mioblasts humans (HMDM)  | DMEM [Piruvat+] 72%<br>M199 24%<br>HS 2%<br>Glutamina 1%<br>Penicilina-streptomicina 1%<br>Insulina 0,1% |
| Medi de diferenciació de mioblasts humans sense sèrum + Penicilina-streptomicina + Insulina (-sèrum PS) | DMEM [Piruvat+] 98,5%<br>Penicilina-streptomicina 1%<br>Insulina 0,1%                                    |
| Medi de diferenciació de mioblasts humans sense sèrum + Gentamicina + Insulina (-sèrum G)               | DMEM-GMAX 99,8%<br>Gentamicina 0,1%<br>Insulina 0,1%   |

Taula 6. Medis de cultiu preparats al laboratori

### 1.7. Preparació de la solució de polímer

L'equip de Biosensors for bioengineering ha publicat la posada a punt d'una nova tècnica d'encapsulació per a cèl·lules de múscul esquelètic de ratolí, a partir de GelMA i CMCMA. El GelMA és un hidrogel fotopolimeritzable compost de gelatina natural funcionalitzada amb anhidrid metacrílic. La funció de la gelatina és proporcionar un suport per a les cèl·lules. El CMC és carboximetil cel·lulosa funcionalitzada químicament amb anhidrid metacrílic, i un material sintètic, com el diacrilat de poli (etilenglicol). La funció de la cel·lulosa és ajudar a mantenir l'estructura en tres dimensions de l'hidrogel. El GelMA i el CMC es dissolen en medi de creixement i es posen al bany a 65 °C durant 3 hores. Abans de barrejar-lo amb la solució de cèl·lules caldrà afegir-li el fotoiniciador LAP, aquesta combinació permetrà formar un hidrogel fotopolimeritzable.

Fins al moment l'experiència d'encapsulació de cèl·lules musculars en 3D en el grup, havia sigut amb cèl·lules de ratolí i ara procedíem a optimitzar aquest model en humans. Per tant un dels paràmetres que calia optimitzar eren els la concentració del polímer així que les percentatges de GelMA, CMCMA i LAP van anar variant al llarg de l'experimentació. Les concentracions finals que es van utilitzar van ser:

- GelMA 5%, CMCMA 0,5% i LAP 0,1% (p/v)
- GelMA 4%, CMCMA 1% i LAP 0,1% (p/v)
- GelMA 3%, CMCMA 1% i LAP 0,1% (p/v)

### 1.8. Preparació del PEGDA

Aquest compost és un dels sintètics no degradables més utilitzats en aplicacions d'enginyeria de teixits el qual impedeix el creixement cel·lular en dues dimensions. En el nostre cas, disposàvem els cultius 3D sobre un cristall. Sobre d'aquest es disposava una pel·lícula d'aquest material, per tal d'assegurar que els mioblasts proliferaven en l'hidrogel de tres dimensions. És característic pel seu caràcter hidròfob, estructura bio inerta i falta de toxicitat o respostes immunitàries. Perquè el PEGDA s'enganxi correctament al cristall és necessari silanitzar el vidre prèviament, activant la seva superfície amb plasma i xilà.

## 1.9. Programes informàtics

| Programa                   | Aplicació   | Referència         |
|----------------------------|---|--------------------|
| ImageJ v.2.0.0-rc-69/1.52p | Anàlisis d'imatges                                | 269a0ad53f         |
| Graphpad prism 5           | Representació de gràfiques i anàlisis estadístics | Applied Biosystems |

Taula 7. Programes utilitzats durant el treball

## 1.10. Recursos en xarxa

| Dase de dades                | Descripció              | Direcció a la xarxa   |
|------------------------------|-------------------------|---|
| <i>Thermo Fisher Connect</i> | Tractament de dades PCR | <a href="https://www.thermofisher.com/es/es/home/digital-science/thermo-fisher-connect.html">https://www.thermofisher.com/es/es/home/digital-science/thermo-fisher-connect.html</a> |
| <i>PubMed</i>                | Consulta bibliogràfica  | <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov</a>   |

Taula 8. Recursos en xarxa utilitzats durant el treball.

## 2. Mètodes

### 2.1. Mètodes Moleculars

#### 2.1.1. Extracció i purificació de RNA total de mioblasts humans

Per l'extracció de RNA partiem de cultius de mioblasts humans en dues dimensions, diferenciats durant 8 dies. Les cèl·lules es va homogeneïtzar en 500 µL TriReagent. Els homogenats s'incubaven durant 5 minuts a temperatura ambient, a continuació se'ls afegia 100 µL de cloroform. Cal que la mescla es barregi rigorosament durant 15 segons i es deixa 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament es centrifugaven les mostres a 12000 g durant 15 minuts a 4 °C. Es transferia la fase aquosa a un tub nou, ajustant el seu volum final a 300 µL, s'utilitzava aigua lliure de RNasa si era necessari. S'afegí 1050 µL buffer RLT i es barrejà les mostres suaument amunt i avall. S'afegí 750 µL d'etanol al 96-100% a la solució diluïda de RNA, barrejant-lo amb l'ajut de la pipeta. Es transferí 700 µL de mostra a una columna de filtratge, col·locada sobre un tub de recol·lecció de 2 mL. A continuació es centrifugà a  $\geq 8000$  g durant 15 segons. Es descarà el líquid transferit al tub col·lector. Es repetí aquest darrer pas fins que tota la mostra fou filtrada. Es va afegir 500 µL d'etanol al 80% a la columna i es va centrifugar a  $\geq 8000$  g durant 2 minuts. Seguidament es va canvia el tub col·lector per un de nou i es va centrifugar a 11000 g durant 5 minuts, per tal d'assecar la membrana. Per últim es va transferir la columna sobre un nou tub de 1.5 mL i se'n

afegir 14 µL d'aigua lliure de RNasa al centre de la membrana de la columna, per acabar es va centrifugar a 11000 g durant 1 minut per tal d'eluir el RNA.

### 2.1.2. Retrotranscripció (RT) (RT-PCR)

La síntesi de cDNA es va fer a partir del volum total de la digestió amb la DNasa I (10 µL, 1 µg de RNA total, 1 µL de 10X DNase I reaction Buffer i 10 µL d'aigua lliure de RNAasa). Vam afegir 1µL de dNTPs 10 mM cada un (Roche) i 1 µL d'Hexàmers (Roche) al RNA i va desnaturalitzar-los a 65 °C durant 5 minuts. Passat aquest temps ràpidament els vam col·locar amb gel i se'ls va afegir 4 µL de *First Strand Buffer*, 2 µL de 0.1 M DTT, 1 µL de RNaseOUT i 1 µL de retrotranscriptasa *SuperScriptII* (Invitrogen). La reacció es va dir a terme amb el termociclador GeneAmp PCR System 9700 d'Applied Biosystems. Les condicions de reacció van ser: atemperació de 10 minuts a 25 °C incubació de 50 minuts a 42 °C i inactivació de 15 minuts a 70 °C. Les mostres controls, no contenien RNA.

#### 2.1.2.1. PCR quantitativa a temps real (qPCR)

L'anàlisi d'expressió de gens es va fer mitjançant una PCR quantitativa a temps real. La síntesi del cDNA es va realitzar amb la retrotranscriptasa *SuperScriptII* (Invitigen) a partir d'1 µg de RNA total prèviament aïllat. Es van analitzar 10 µg de cDNA per reacció usant el *5x hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus* (ROX) (Solis Biodyne). Per cada mostra es van realitzar dues rèpliques, es va introduir un control negatiu i com a control endogen es va utilitzar el gen GAPDH. La reacció es va dur a terme amb el termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* d'*Applied Biosystems*. Les condicions de la reacció van ser: 50 °C durant 2 min, 95 °C durant 10 minuts i 40 cicles de 15 segons desnaturalització a 95 °C seguits d'1 minut d'hibridació i amplificació a 60 °C. Al final de cada reacció es va realitzar un protocol de dissociació per assegurar la presència d'un únic amplicó. L'expressió relativa es va calcular amb el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 2.1.3. Tincions

La tinció histoquímica, és una reacció química en la qual intervenen molècules que pertanyen al pròpi teixit. L'objectiu és posar en manifest una molècula o família de molècules de la mostra. Concretament vam utilitzar la tinció d'Hematoxilina-Eosina. La Hematoxilina té un caràcter bàsic, per això s'unirà amb els àcids nucleics tenyint-

los de tons blavosos i lilosos, en canvi l'eosina té un caràcter àcid i tenyirà el citoplasma de colors rosats. Aquesta és una tècnica molt útil per observar si els mioblasts s'han fusionat per tal de formar miotubs. Utilitzant micrografia de contrast de fases.

La tinció de DAPI-Fal·loïdina en canvi és un tipus de funció on intervé la fluorescència. El DAPI és un marcador de fluorescència blau que té un caràcter intercalant a les regions de l'ADN riques en adenina i timina. La fal·loïdina és una micotoxina produïda pel fong *Amanita phalloides*, que impedeix la despolimerització de filaments d'actina, en aquest cas en combina amb la rodamina, un compost orgànic fluorescent, aquest complex marca el citoesquelet. Amb aquesta tinció es pot comprovar si el cultiu ha arribat a diferenciar-se i formar miotubs.

## 2.2. Mètodes cel·lulars

### 2.2.1. Condicions de cultiu de mioblasts i transdiferenciació/diferenciació

Els mioblasts creixien en medi de creixement GM. Les condicions de creixement eren en un incubador de 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> en ampolles de creixement de 175 cm<sup>2</sup>.

Per tal d'induir la diferenciació miogènica, és necessari canviar el medi de creixement per medi de diferenciació un cop la confluència de les cèl·lules és del 75%, nosaltres sembràvem nombre òptim per tal que 24 hores després ja tinguessin aquesta confluència. La diferència entre aquests dos medis és el percentatge de sèrum que contenen, el medi de diferenciació té una concentració molt baixa de sèrum, la qual cosa facilita la diferenciació i formació de miotubs. Una de les optimitzacions realitzades aquest treball ha estat posar a prova quin és el medi de diferenciació òptim pel cultiu 3D de mioblasts. Durant l'etapa de diferenciació l'ambient que necessiten les cèl·lules no varia 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> atmosfèric.<sup>11</sup>

### 2.2.2. Control rutinari dels cultius cel·lulars.

Regularment s'analitzava la morfologia dels mioblasts i miotubs amb el microscopi *Axio Observer* de *Zeiss*. La finalitat era comprovar que les cèl·lules tinguessin la morfologia corresponent al seu estat de proliferació, controlar la confluència, a més d'assegurar-se que no hi havia cap partícula sospitosa que pogués contaminar els medis. Durant aquests controls rutinaris es feien fotografies i filmacions per estudiar

el procés de diferenciació dels mioblasts. A més a més es comprovava que el medi fos transparent i mantingués un color adequat, que el color del medi de cultiu fos l'adequat, així en asseguràvem que el pH del cultiu es mantenia estable.

### 2.2.3. Recompte de cèl·lules

Per calcular el nombre de cèl·lules d'un cultiu, aixecàvem les cèl·lules i les recol·lectàvem en un falcó de 50 mL, seguidament el centrifugàvem, trèiem el sobrenedant i acuradament resuspeníem el pellet en 10 mL de medi complet. A continuació s'agafaven 15 µL de la solució de mioblasts i es mesclaven amb 15 µL de blau de tripà. A partir d'aquesta segona solució on els mioblasts ja estaven tenyits amb el colorant vital, s'agafaven 10 µL d'aquesta solució i es transferien a una càmera de comptatge que s'introduïa a l'aparell Countess II de *Thermo Fisher Scientific*.

### 2.2.4. Subcultius de cèl·lules adherents

Les cèl·lules metabolitzen els nutrients del medi però també alliberen els residus del seu metabolisme en ell, això fa que a poc a poc el medi es vagi acidificant i adquirint un caràcter tòxic. Així doncs per tal de mantenir un ambient cel·lular ric en nutrients, lliure de tòxics i patògens, s'ha renovat el medi del cultiu tres cops per setmana en tots els cultius d'aquest projecte. També cal tenir en compte que les cèl·lules estan en constant divisió durant el cultiu, i a poc a poc l'àrea que ocupen va augmentant. El marcador que indicarà quan és necessari realitzar un subcultiu és la confluència la qual quantifica l'esgotament de l'espai lliure. Tots els subcultius s'han realitzat quan la confluència era del 75%, si se sobrepassa aquest valor, les cèl·lules comences a diferenciar-se i perden la capacitat de créixer i multiplicar-se. Al realitzar un subcultiu el primer que fèiem eren un parell de rentats amb PBS, per tal d'assegurar-nos que no quedaven restes de medi en el cultiu. Seguidament s'afegeixen 2 mL de tripsina i amb moviments suaus es repartien per tota la superfície inferior del flascó, aquest reactiu fa que les cèl·lules es desenganxin i es quedin en solució (no es pot deixar que actui més de 5 minuts, ja que podria lisar les cèl·lules). Un cop les cèl·lules estaven desenganxades s'inactivava la tripsina amb 10 mL medi de creixement el qual conté un alt contingut en sèrum, component que inactiva la tripsina. Per assegurar-se que no quedaven restes de tripsina es traspassava la solució a un falcó de 15 mL i es centrifugava durant 5 minuts a 1.2 rpm. A continuació s'aspirava amb compte el

sobrenedant i és resuspenia el pellet amb el volum desitjat de medi de creixement, finalment es traspasa la solució de cèl·lules a una nova ampolla de cultiu.

#### *2.2.5. Descongelació de línies cel·lulars*

Per descongelar els mioblasts, trèiem un vial del tanc de N<sub>2</sub> líquid i el descongelàvem parcialment a temperatura ambient. Seguidament passàvem les cèl·lules a un falcó de 15 mL i li afegíem 10 mL de medi de creixement complet temperat prèviament a 37 °C. Ràpidament centrifugàvem durant 3 minuts a 1.2 rpm i retiràvem el sobrenedant, per eliminar els restes del crioprotector DMSO i de cèl·lules inviables. A continuació resuspeníem el pellet en 1 mL de medi de creixement complet temperat a 37 °C i traspassàvem la solució a una ampolla de cultiu.<sup>12</sup>

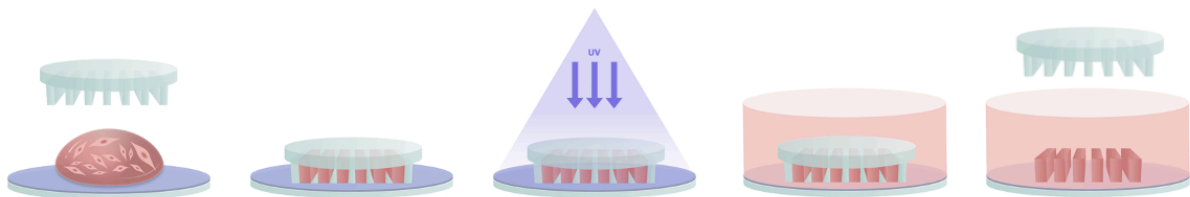
#### *2.2.6. Preparació de plaques de cultiu en 2D*

Perquè les cèl·lules no s'adhereixin directament sobre el plàstic de la placa de cultiu, posàvem una pel·lícula de col·lagen tipus 1 al fons de la placa. Així els mioblasts creixien sobre un biomaterial més flexible que facilitava el seu desenvolupament, però sobretot la seva diferenciació i fusió per tal de crear miotubs madur. Per a fabricar aquesta pel·lícula, inicialment calia preparar una solució homogènia de PBS 1X i col·lagen tipus 1 al 50 µg/mL. A continuació s'afegia la quantitat de volum necessari que cobrís el fons de la placa que es vol cultivar. Seguidament es deixava reposar 1 hora, a 37 °C per tal que el col·lagen polimeritzés i formés la pel·lícula. Posteriorment es feien tres rentats amb PBS i s'aspirava tot el líquid de la placa i es deixava que la pel·lícula s'assequés completament a l'interior de la cabina de cultiu. Un cop seca ja estava a punt per ser sembrada.

#### *2.2.7. Encapsulació de cèl·lules en micropatterns 3D*

Per encapsular les cèl·lules en tres dimensions, es va utilitzar una fotomultatge.<sup>13</sup> Per a produir aquests cultius era necessari que les cèl·lules es mesclin amb algun material que els permeti formar una envestida en tres dimensions sobre la qual és poguessin adherir. En el nostre cas vam barrejar els mioblasts humans amb polímer. Un dels factors que volíem optimitzar era la concentració de cèl·lules en els cultius 3D i la composició del polímer, per això els volums variaven en funció del que es volia estudiar. Un cop feta la solució de polímer i mioblasts, es col·locava una gota de 8 µL

sobre un vidre amb PEGDA. A continuació es premsava lleugerament amb un segell de PDMS de 6 mm de diàmetre amb solcs de 100  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  o de 300  $\mu\text{m}$  d'amplada i 100  $\mu\text{m}$  150  $\mu\text{m}$  200  $\mu\text{m}$  i 200  $\mu\text{m}$  d'alçada corresponentment. Durant aquest pas calia assegurar-se que la solució de mioblasts i polímer s'expandien per tots els canals cobrint tota la superfície del segell. Aquests canals donant forma al cultiu 3D facilitava que els mioblasts, es fusionessin i es diferenciessin en miotubs. Seguidament l'hidrogel és fotocrosslinava utilitzant un làmpada reticulosa UVP (model CL-1000L, 365 nm, 40 W, d'Analytik Jena EUA, Upland, EUA), amb un temps d'exposició de 24 segons. En aquest moment els radicals es catalitzaven i polimeritzaven fent que el cultiu cel·lular adopti la forma 3D del motlle. Seguidament s'incorporava el medi de creixement prèviament temperat a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> ambiental i es deixava a l'incubador durant 30 minuts. Passat aquest temps es retirava el segell amb cura. 24 hores després d'aquest procés es va canviar el medi de creixement per medi de diferenciació per promoure la formació de miotubs.



Il·lustració 1. Esquema gràfic del procés d'encapsulació amb la tècnica de fotomoltatge.

### 2.2.8. Estimulació elèctrica dels miotubs

L'estimulació de pols elèctric és un mètode *in vitro* que serveix per induir la contracció de cèl·lules esquelètiques musculars d'origen animal o humà. *In vivo* la contracció de les cèl·lules musculars és regulada per les neurones motores, en aquest estudi aquesta activació és substituïda per pols elèctrics. L'objectiu és provocar artificialment la contracció en el cultiu cel·lular per tal d'estudiar el moviment dels miotubs. Per aquesta tasca s'utilitzava una placa *C-Dish* amb elèctrodes de carboni. La diferència amb altres plaques de cultius és que en aquesta s'adapta a una tapa especial per a realitzar estimulacions elèctriques a cultius cel·lulars. Aquesta tapa disposa de dos elèctrodes de carboni utilitzats en EPS crònica de baixa freqüència en cada pou. La placa va connectada a un alternador (on es pot determinar el voltatge, la intensitat i l'amperatge) que aplica un camp elèctric sobre el cultiu. El funcionament és simple, dins el pou es disposa el teixit el qual es vol estimular i el propi medi actuarà com a conductor de les càrregues elèctriques. Els paràmetres que majoritàriament es fan

servir per a aquest estudi són; intensitat de 1ms, voltatge de 10 V/cm<sup>2</sup> i freqüència 0.5, 1 o 2 Hz per cada pou de la placa.<sup>14</sup>

#### 2.2.9. Estudi de la contracció dels miotubs

Per tal d'avaluar el funcionament de múscul esquelètic en cultiu, es va estudiar la capacitat de contracció a partir d'estímuls elèctrics. Durant aquestes estimulacions elèctriques, es van realitzar gravacions. Aquests vídeos van ser processats pel programa *Image J*, i amb les dades que en vam extreure vam realitzar estudis sobre el moviment dels miotubs. L'objectiu d'aquesta tasca era confirmar la hipòtesi que els moviments de contracció i la resposta al calci de les cèl·lules havia de ser corresponent al Hz aplicats. A més a més com que la línia cel·lular d'aquest treball, és de mioblasts humans sants, les dades del moviment es poden fer servir com a control en un futur, quan els cultius vinguin de cèl·lules de pacients de DM1.<sup>15</sup>

#### 2.2.10. Anàlisi dels ions de calci intracel·lulars

En varies ocasions s'han demostrat que els canvis en el gradient de calci són importants per a diversos processos biològics. Com que el gradient intracel·lular de calci és molt gran, petits canvis en el calci intracel·lular [Ca<sup>2+</sup>] poden produir grans modificacions cel·lulars. En els darrers anys els indicadors de calci visibles s'han establert com a eines importants per a la transducció de senyal i les proves farmacològiques basades en cèl·lules. Aquestes petites entitats químiques (per exemple Fluo-4) mostren una alta sensibilitat i un gran augment fluorescent a partir de la unió al calci. Mitjançant l'ús d'aquesta sonda *Fluo-4 Calcium Imaging Kit* es va demostrar que el moviment de ions de calci de les membranes dels miotubs en cultiu, estava sincronitzat amb la freqüència elèctrica aplicada. L'ús de la sonda de calci és molt senzill, només cal seguir els passos establerts pel kit comercial.<sup>15-16</sup>

## Resultats i discussió

### Estudi a la resposta elèctrica de mioblasts de ratolí C2C12.

Per tal de confirmar que el nostre sistema elèctric era capaç d'estimular i induir la contracció. Es van sembrar  $2 \cdot 10^8$  cèl·lules/pou, 24 hores després ja tenien la confluència necessària per començar-se a diferenciar, per això vam canviar el medi de creixement per medi de diferenciació.

Normalment les cèl·lules C2C12, tenen una gran capacitat de fusionar-se creant miotubs capaços de contraure's de forma espontània, per aquest motiu la idea inicial era utilitzar aquesta línia cel·lular com a control. En aquest cas però era diferent, sabíem que les cèl·lules de *Mus musculus* amb les que treballàvem no tenien la capacitat de contraure's per si soles, i tampoc responien a l'estimulant elèctrica. Aquest podria ser un dels problemes que podríem trobar durant l'estudia de cèl·lules de pacients de DM1. Després de realitzar una recerca bibliogràfica, vam dissenyar tres models d'entrenament durant els dies 5, 6 i 7 que prepararien els mioblasts per contraure's durant l'estimulació final del dia 8.

El **model A-control**: estimulació directa el dia 8, sense període d'entrenament.

El **model B**: quatre repeticions d'una hora d'estimulació seguida d'una hora de descans en acabar descans *over night*.

El **model C**: estimulació durant 8 hores seguides de 16 hores de descans + estimulació el vuitè dia.

L'estimulació costava de [5 V 1 Hz 1 ms (2 V/cm<sup>2</sup>)]. El vuitè dia de l'estudi vam realitzar l'estimulació elèctrica final però no vam observar cap contracció. El primer que vam pensar era que el mètode d'entrenament no tenia la capacita d'activar la contracció de les cèl·lules. Però sabíem que aquestes cèl·lules en concret tenien la capacitat intrínseca de contraure's i això ens va fer pensar que hi havia un error en el sistema elèctric.

Al fixar-nos en l'estructura de la placa, vam veure que els sis elèctrodes es disposaven de forma paral·lela, fent que el voltatge es dividís entre 6. Aplicàvem molt menys

voltatge del que pensàvem, així que vam decidir realitzar un seguit de comprovacions elèctriques del nostre sistema.

El primer que vam comprovar era que el voltatge augmentava al reduir el nombre de pous que contenien cultius, ja que el voltatge és repartia en un nombre menor de pous. Per tal de validar la tensió de sortida de l'equip, vam utilitzar un amperímetre per calcular el voltatge que arribava a cada pou. Veure els resultats a la taula 8. Fins ara havíem estudiat un mètode d'entrenament on el voltatge que s'utilitzava era 5 V, però sabíem que en un futur la intenció era realitzar estimulacions a 25 V, com es pot observar a la taula 8 el sistema que utilitzàvem inicialment no era capaç de proporcionar aquesta tensió, és per això que vam connectar un amplificador al generador d'ones i vam tornar a caracteritzar el corrent, els resultats es mostren a la taula 8. Amb la remodelació del sistema sí que era possible realitzar estimulacions de 25 V.

| Pous utilitzats | Generador d'ones | Generador d'ones + amplificador |
|-----------------|------------------|---------------------------------|
|                 | Tensió           | Tensió                          |
| 1 pou           | 10 V             | +40 V                           |
| 2 pous          | 10 V             | 30 V                            |
| 3 pous          | 7 - 8 V          | 20 ~ 28 V                       |
| 4 pous          | 6 V              | 15 V                            |
| 5 pous          | +5 V             | 10 V                            |
| 6 pous          | 5 V              | 8 V                             |

*Taula 3. Estudi de la tensió segons els pous utilitzats amb o sense amplificador. Distància entre els elèctrodes 2,5cm, 2mL de medi/pou*

### **Estudi de la resposta elèctrica de mioblasts humans en cultiu 2D**

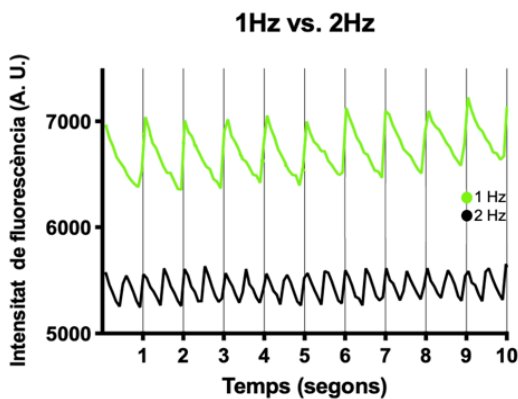
Ja que la finalitat del treball és caracteritzar mioblasts humans i vist que els mioblasts de ratolí no ens servien com a control positiu en aquest estudi, vam procedir a cultivar mioblasts humans procedents d'individus sans.

La mida dels mioblasts humans és major les C2C12, així que per aconseguir la confluència necessària perquè hi hagi diferenciació i formació de miotubs madurs, és necessari sembrar una concentració menor  $6 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou. El sembratge va ser directament sobre la placa de cultiu. Vint-i-quatre hores després vam observar les cèl·lules al microscopi i vam confirmar que la confluència era l'adequada, així que vam prosseguir amb l'estudi, reemplaçant el medi de creixement per medi de diferenciació. Veure el procés de diferenciació del cultiu a la il·lustració 3.

El dia 8 vam confirmar que els mioblasts s'havien diferenciat i fusionat formant miotubs, així que vam procedir a realitzar l'estimulació elèctrica del cultiu, aplicant 10

V/cm<sup>2</sup> durant 1 ms i freqüències Hz (2 Hz, 1 Hz i 0,5 Hz) dins la cabina del microscopi. Amb l'ajut d'aquest instrument, vam poder observar un lleuger moviment de contracció en els miotubs més desenvolupats durant l'estimulació.

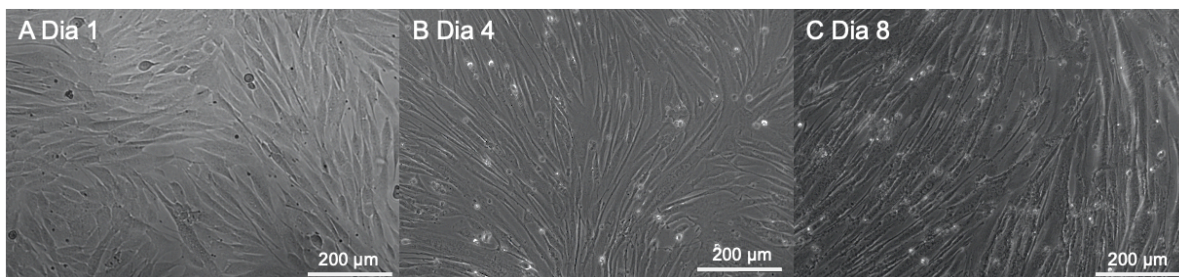
Pel que fa a la resposta dels ions de calci, la gravació de cèl·lules en viu, va permetre registrar canvis en la intensitat de la fluorescència (moviment dels ions) durant l'estimulació. En aquest cas també vam comprovar les velocitats dels pics de fluorescència procedent dels miotubs estaven sincronitzats amb les freqüències aplicades en cada moment. En el vídeo 1 la freqüència és de 1 Hz (<https://youtu.be/IVFzleeuUoQ>) en el vídeo 2 la freqüència aplicada és de 2 Hz (<https://youtu.be/KexAP2WHClk>).



Il·lustració 2. Representació gràfica de la intensitat de fluorescència en un fragment de 10 segons, aplicant 1 Hz o 2Hz.

La gràfica mostra un fragment de 10 segons del vídeo, on els instants amb més fluorescència corresponen als pics. Observant les dades podem afirmar que aplicant al aplicar 1 Hz hi ha un pic de fluorescència cada segon, en canvi a l'aplicar una freqüència de 2 Hz, el pic de fluorescència és cada 30 segons.

Comparant els dos estudis vam observar que una major quantitat de miotubs responien als ions de calci. El fet que els miotubs fossin capaços de captar el calci, però no de contraure's, ens va fer pensar que la rigidesa del plàstic on les cèl·lules es trobaven adherides dificultava el moviment de contracció. La solució a aquest problema la proporcionaria el cultiu 3D que a la vegada recrea un ambient més semblant al del teixit muscular *in vivo*.



Il·lustració 3. Micrografia de contrast de fases de cèl·lules musculars humanes durant el protocol de diferenciació. Cultiu 2D de mioblasts humans  $6 \cdot 10^5$  [cèl·lules/pou]. La imatge A correspon al dia 1 abans d'induir la diferenciació, la imatge B correspon al dia 3 des de la diferenciació, on es pot observar que les cèl·lules s'estan fusionant creant microtúbuls. La imatge C correspon al dia 8 abans de l'estimulació.

## Estudi de la resposta elèctrica de mioblasts humans en cultiu 3D

El gran avantatge dels cultius cel·lulars en 3D és que les cèl·lules poden créixer en els tres eixos de coordenades adherint-se unes a les altres. Aquestes condicions haurien d'augmentar la flexibilitat.

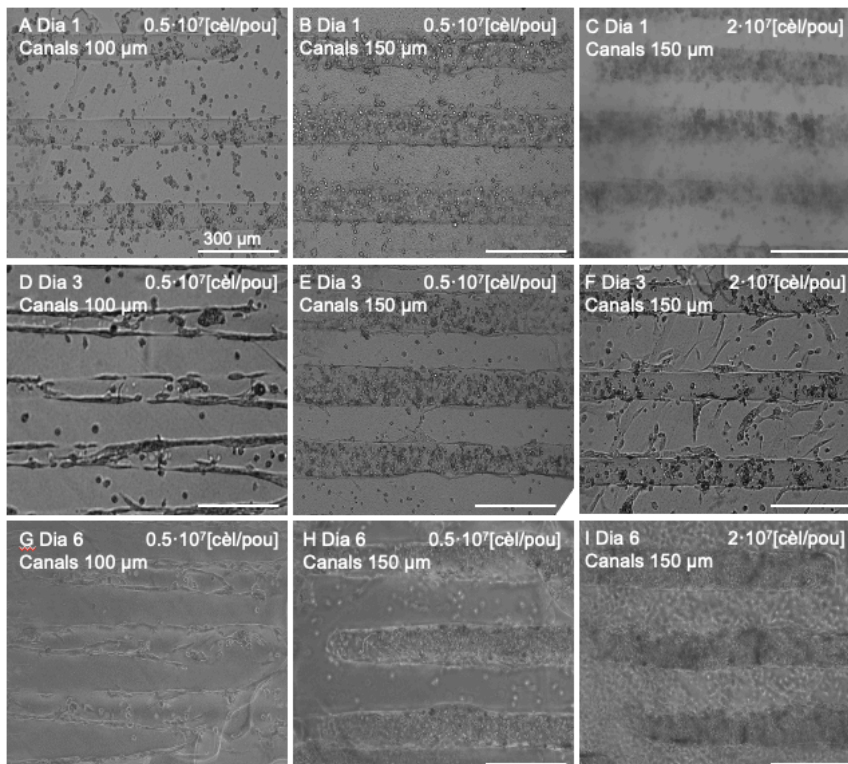
Fins al moment l'experiència d'encapsulació cèl·lules musculars en 3D en el grup, havia sigut amb cèl·lules de ratolí i ara procedíem a optimitzar aquest model en humans. Són moltes les variables a tenir en compte per posar a punt un cultiu, però en aquest apartat vam començar per dues, la concentració cel·lular i l'amplada dels canals de l'estructura. Vam dissenyar tres models d'estudi:

**Model A:**  $0,5 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, encapsulades amb motlles de canals de  $100 \mu\text{m}$

**Model B:**  $0,5 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, encapsulades amb motlles de canals de  $150 \mu\text{m}$

**Model C:**  $2,5 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, encapsulades amb motlles de canals de  $150 \mu\text{m}$

El suport 3D estaria compost del GelMA al 5% i CMC al 0,5%. L'endemà de l'encapsulació vam observar que les cèl·lules s'havien alineat i estaven preparant-se per fusionar-se i crear miotubs, per això es va reemplaçar el GM per HMDM.



*Il·lustració 4 Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 3D durant el protocol de diferenciació. Les imatges A, D i G tenen unes condicions de  $0,5 \cdot 10^7$  [cèl·lules/pou] i canals de  $100 \mu\text{m}$ . La imatge A mostra el cultiu al dia 1 de diferenciació, D a dia 3 i G a dia 6. Les imatges D, E i H les cèl·lules es troben en una concentració de  $0,5 \cdot 10^7$  [cèl·lules/pou] i els canals són de  $150 \mu\text{m}$ . La imatge B mostra el cultiu al dia 1 de diferenciació, E a dia 3 i H a dia 6. Les imatges C, F i I mostren les cèl·lules que es troben a una concentració de  $2,5 \cdot 10^7$  [cèl·lules/pou] i els canals són de  $150 \mu\text{m}$ . La imatge C mostra el cultiu al dia 1 de diferenciació, F a dia 3 i I a dia 6.*

La diferenciació es va desenvolupar correctament, i el dia 6 vam observar que s'havien format diversos miotubs, així que vam procedir a realitzar l'estudi de la resposta elèctrica del cultiu. L'estimulació es va realitzar a 25V, 1Hz, 1ms (15V/cm<sup>2</sup>).

Durant l'estimulació no vam poder observar contracció dins el cultiu 3D, però a l'allunyar-nos d'aquesta estructura vam trobar cèl·lules que havien crescut i s'havien diferenciat sobre la placa en 2D, aquestes cèl·lules sí que tenien la capacitat de contraure's. Seguidament vam estudiar la resposta del cultiu als ions de calci, però sembla ser, que la sonda és inefectiva al no va entrar correctament dins l'estructura de GelMA i CMC, tota l'estructura quedava marcada totalment per fluorescència i era impossible diferenciar-ne les cèl·lules. Vam observar les cèl·lules en cultiu 2D del voltant, aquestes sí que responen correctament al calci. Semblava ser, que l'estructura de GelMA i CMC no era la més indicada per realitzar aquest tipus d'estudi. En relació als diferents models vam concloure que en un futur utilitzaríem una concentració intermèdia de  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, pel que feia als canals ens va semblar que els més adequats eren els de 150  $\mu\text{m}$  d'amplada.

### **Estudi de canvi de materials**

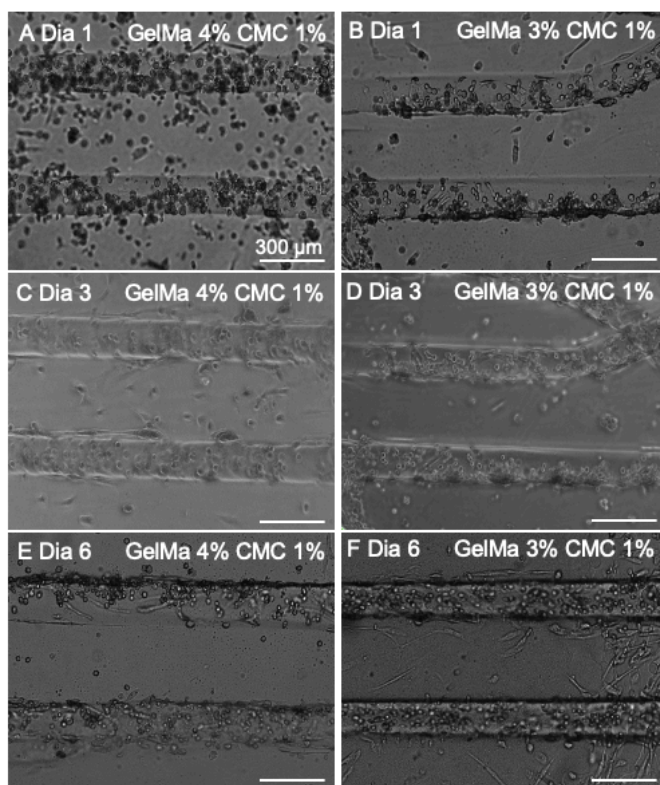
En aquest cas vam centrar-nos en una sola variable, el material de l'estructura 3D: GelMA-CMC i col·lagen.

El primer objectiu era provar diferents concentracions de GelMA i CMC per intentar trobar una composició que permetés el correcte desenvolupament de les cèl·lules i el seu estudi. Vam dissenyar dos models:

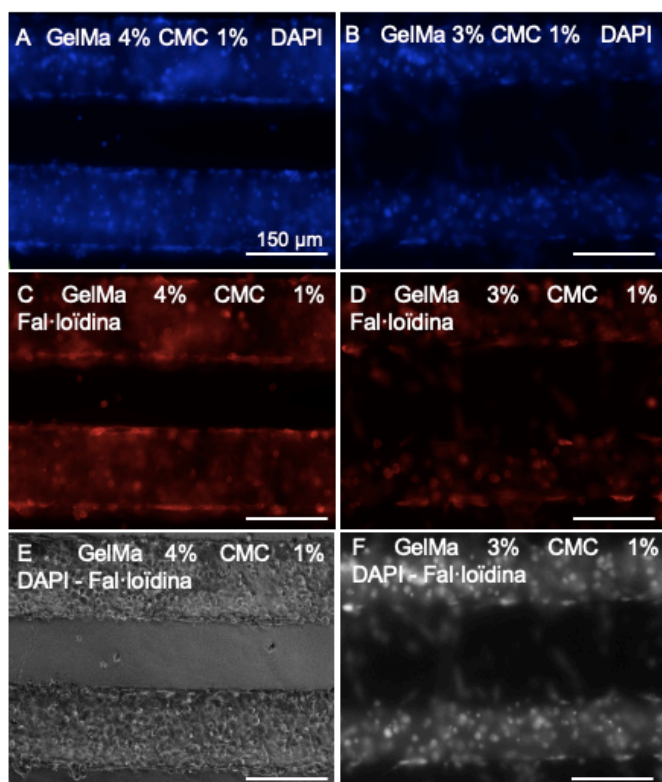
**Model A:**  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, encapsulades amb motlles de canals de 150  $\mu\text{m}$  GelMA 4% i la de CMC 1%

**Model B:**  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules/pou, encapsulades amb motlles de canals de 150  $\mu\text{m}$ , GelMA es troba al 3% i el CMC al 1%.

24h després d'encapsular les cèl·lules vam observar-les per confirmar que tenien bon aspecte, i vam procedir amb l'estudi canviant el GM per HMDM.



*Il·lustració 5. Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 3D durant el protocol de diferenciació, en una concentració de  $1 \cdot 10^7$  [cèl·lules/pou] i canals de 150  $\mu\text{m}$ . Les imatges A, C i E (model A) el polímer te unes condicions de GELMA 4% CMC 1%. La imatge A mostra el cultiu al dia 1 de diferenciació, C a dia 3 i E a dia 6. Les imatges B, D i F (model B), el polímer te unes condicions de GELMA 3% i CMC 1%. La imatge B mostra el cultiu al dia 1 de diferenciació, D a dia 3 i F a dia 6.*



Però en aquest cas a l'observar les cèl·lules l'últim dia vam veure que no havien arribat a diferenciar-se de forma correcta en cap dels dos casos. Seguiment fotogràfic a la il·lustració 5. Amb aquests resultats vam decidir no realitzar l'estimulació elèctrica. El que sí que vam fer va ser una tinció histoquímica amb Hematoxilina-Eosina. Aquesta tinció permet tenyir el citoplasma de colors rosats i el nucli de tons lilosos. És una tècnica molt útil per observar si els mioblasts s'han fusionat per formar miotubs. Utilitzant micrografia de contrast de fases no vam poder observar res, ja que aquesta tècnica constar de molts rentades, fet que va arrugar i desenganxar la capa de PEGDA del cristall, destruint gran part del cultiu.

Com a alternativa vam realitzar una tinció de DAPI-Fal·loïdina. El DAPI és un marcador de fluorescència blau que té un caràcter intercalant a les regions de l'ADN riques en adenina i timina. La fal·loïdina combinada amb la rodamina, marca el citoesquelet. El resultat d'aquesta tinció es mostra a la il·lustració 6. En ella es pot confirmar que en aquests cultius no s'han arribat a formar miotubs tal com s'esperava.

*Il·lustració 6. . Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 3D, tinció DAPI-Fal·loïdina*

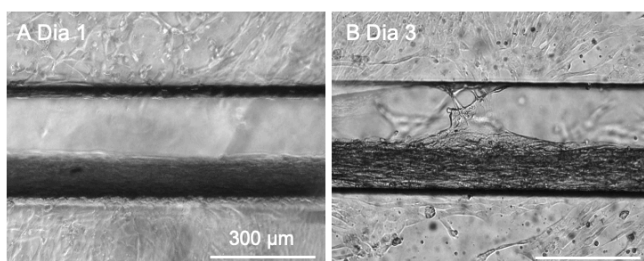
D'altra banda també vam realitzar una encapsulació amb col·lagen tipus I. Aquest tipus de col·lagen és el més abundant del cos humà i la seva funció principal és la resistència a l'estirament. Aquest fet hauria de ser de gran ajut per a poder observar el moviment de contracció en els miotubs. Una de les propietats del col·lagen és la seva tendència a compactar-se. Aquesta predisposició pensàvem que seria d'ajut, ja que facilita la forma dels miotubs. Per aquest motiu, vam utilitzar motlles amb canals de diàmetre 300  $\mu\text{m}$ . Un altre fet que també vàrem tenir en compte va ser la capacitat de les cèl·lules de digerir el col·lagen. Aquesta propietat podia fer que els mioblasts degradessin el material abans del dia d'estudi, és per això que vam plantejar un segon estudi paral·lel proposant tres models de tractament amb agent enduridor el qual aportarà duresa al col·lagen, evitant així la degradació de l'estructura, vam dissenyar tres models.

El **model A- control**: sense tractament amb un agent químic enduridor.

El **model B**: fixació de l'estructura de col·lagen en el moment de l'encapsulació

El **model C**: fixació de l'estructura de col·lagen 24 h després de l'encapsulació.

En aquest estudi vam cultivar una concentració de  $1,5 \cdot 10^7$  cèl·lules per pou. En el moment de l'encapsulació el col·lagen es va compactar tal com esperàvem, però el problema va venir al separar el motlle de l'estructura de col·lagen i cèl·lules. El col·lagen va quedar adherit al motlle, així que vam haver de cultivar el propi motlle. Per tal de no danyar els motlles, vam decidir cultivar tots els cultius segons el model A, i deixar el model B i C per mes endavant. A les 24 h hores de l'encapsulació vam observar els cultius i semblava que podíem continuar endavant amb l'estudi, ja que les cèl·lules seguien el curs esperat. El segon problema va aparèixer amb tard, amb l'evolució dels dies el col·lagen sí que s'anava desenganxant del motlle i a poc a poc va crear una xarxa complexa de canals entrelaçats impossible d'estudiar.



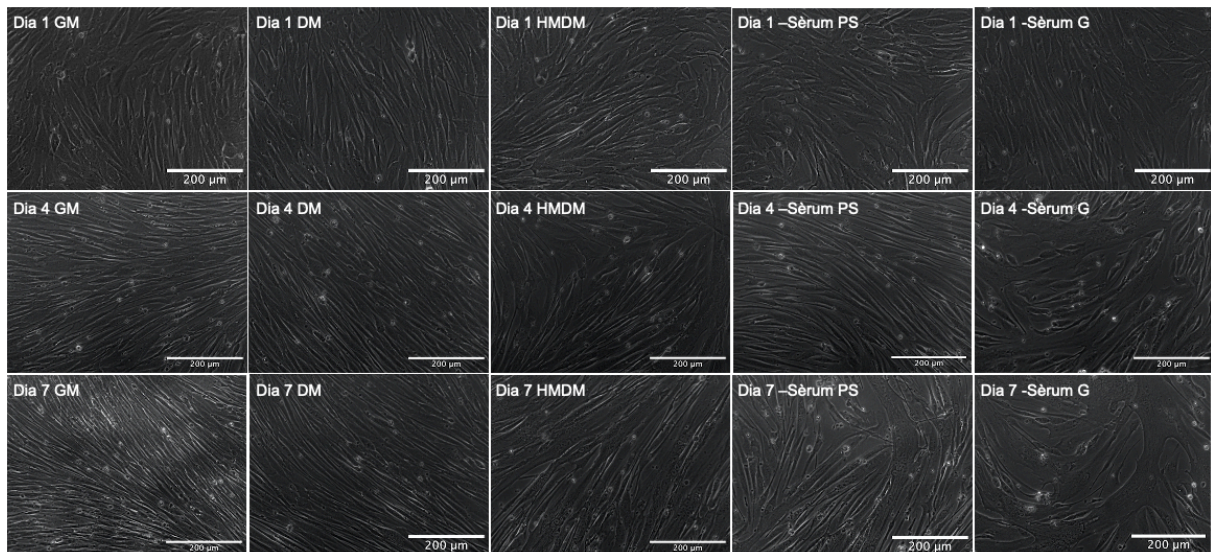
*Il·lustració 7 Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 3D durant el protocol de diferenciació. Les cèl·lules tenen una concentració de  $1,5 \cdot 10^7$  [cèl·lules/pou] i els canals són de 300  $\mu\text{m}$ . La imatge A correspon al dia 1 de la diferenciació del cultiu i la B dia 3 del cultiu.*

Per nosaltres era essencial aconseguir l'estructura 3D sense necessitat de cultivar el motlle i tots els que ens vam trobar en aquest experiment va demostrar que la tècnica Photomelting no era la més adequada per aconseguir models 3D basats en col·lagen, per això vam tornar a la nostra idea inicial encapsular amb GelMA i CMC.

## Estudi dels medis de diferenciació en 2D

Durant la recerca bibliogràfica<sup>17</sup> vam observar que hi havia molta diversitat en les composicions dels medis de diferenciació que s'utilitzaven en els diferents estudis, per aquest motiu vam decidir posar a prova els quatre medis més utilitzats i analitzar quin produïa els majors nombre de miotubs madurs. Els medis que vam provar van ser: DM, HMDM, -sèrum PS i -sèrum G. Com a control negatiu vam utilitzar medi de creixement GM

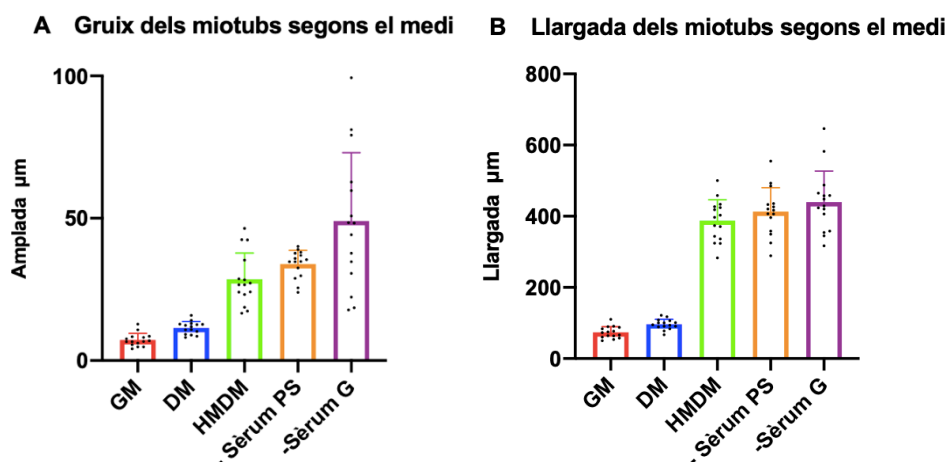
Vists els problemes tècnics que havíem tingut fins al moment amb els models en tres dimensions vam decidir que aquest estudi primer el realitzaríem en dues dimensions. Per millorar l'ambient cel·lular es va sintetitzar una pel·lícula de col·lagen tipus 1 al fons del pou sobre la qual es va sembrar una concentració de  $2.3 \cdot 10^6$  cèl·lules per placa. 24 hores després vam comprovar que tingués una bona confluència i es va reemplaçar el medi de creixement pels diferents medis de diferenciació. Es va fer un seguiment fotogràfic on es pot veure l'evolució dels diferents cultius.



Il·lustració 8. Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 2D durant el protocol de diferenciació. Les cèl·lules tenen una concentració de  $2.3 \cdot 10^6$  [cèl·lules/pou]. La primera fila correspon al dia 1 de diferenciació, la segona al dia 4 i la tercera a dia 8. La primera columna mostra l'evolució del medi GM, la segona del DM, la tercera HMDM, la quarta -sèrum PS i la cinquena a -Sèrum G.

Fent una anàlisi sobre la morfologia dels cultius podem concloure que els quatre medis provats van complir els objectius, en totes ells els mioblasts es van diferenciar formant miotubs madurs, però les diferències a simple vista eren significatives, el medi que havia produït un major nombre de miotubs madurs era el -sèrum G, seguit pel -sèrum PS i pel HMDM, finalment el DM, tal com s'esperava en el GM, on el nivell de sèrum és major els mioblasts no es van arribar a diferenciar. Per tal de quantificar la mida

dels tubs, es van analitzar tres fotografies del dia 7 de cada condició, en cada una d'elles s'ha mesurat el diàmetre de 5 tubs. En la il·lustració 9 A, es mostren les mitjanes de les amplades dels miotubs segons el medi de diferenciació. Amb aquest estudi, hem arribat a la mateixa conclusió, el medi que proporciona una major diferenciació en un menor temps és el medi -Sèrum G, seguit per -sèrum PS, HMDM i finalment el medi DM, cal remarcar que la diferència entre aquest darrer i el medi control és molt petit. La desviació estàndard ens demostra que tot i que en el medi -Sèrum G hi ha tubs molt gruixuts, també n'hi ha de més prims, l'amplada dels tubs no és uniforme. A la vegada també es van mesurar la llargada de 15 tubs en cada condició, els resultats es mostren a la il·lustració 9 B, en ells podem veure clarament que les llargades dels tubs és semblant en els medis -Sèrum G, -Sèrum PS i HMDM, en el cas de DM la llargada dels seus miotubs indica que hi ha hagut poca fusió dels mio blasts.

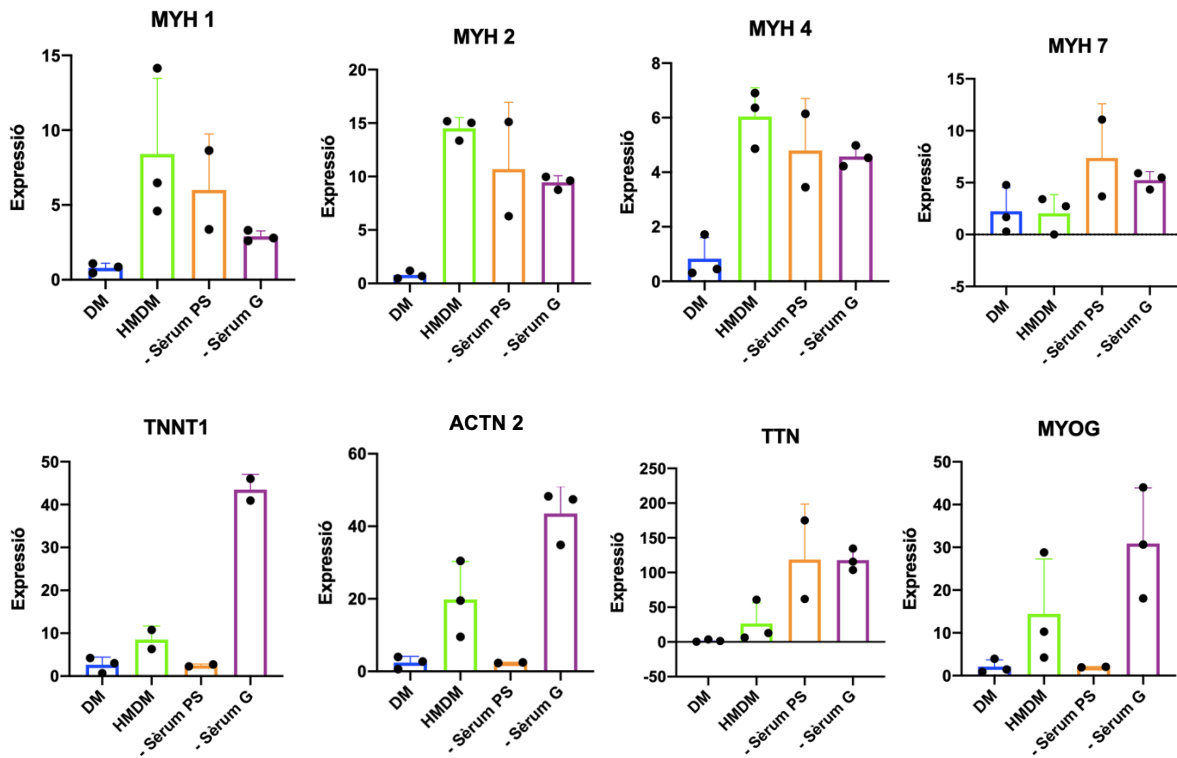


*Il·lustració 9. Gràfica A: gruix dels miotubs després de 7 dies de diferenciació en diferents medis de cultiu. Gràfica B llargada dels miotubs després de 7 dies de diferenciació en diferents medis de cultiu.*

Per tal de fer una caracterització molecular de la diferenciació muscular, vam analitzar l'expressió considerats marcadors de diferenciació. Abans però vam realitzar una extracció de RNA amb la finalitat de fer una qPCR. Es van analitzar 9 gens; com a gen de referència vam utilitzar GAPDH, i com a gens que s'expressen durant la diferenciació muscular MYH 1, MYH 2, MYH 4, MYH 7, TNN, MYOG, ACTN 2 i TNNT1.<sup>18-19</sup> La qPCR va funcionar correctament en la il·lustració 10 es mostren els nivells d'expressió de cada un dels gens segons els medis de diferenciació utilitzat, tots ells s'han normalitzat amb els valors d'expressió del gen GAPDH.

Aquest procediment el vam haver de repetir en dues ocasions, ja que en el primer cas vam sembrar  $6 \cdot 10^5$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous. En el moment de l'extracció vam obtenir una quantitat molt petit de RNA i els resultats de la PCR no van sortir gens

bé. Per això vam repetir l'experiment sembrant els mioblasts en places petri, en aquest cas sí que van aconseguir aïllar una quantitat significativa de RNA. A continuació es mostren els nivells d'expressió dels gens marcadors de diferenciació muscular procedents de l'extracció de RNA de la segona sembra en plaques petri.



Il·lustració 10. Expressió dels diferents gens, després de 7 dies en diferents medis de diferenciació.

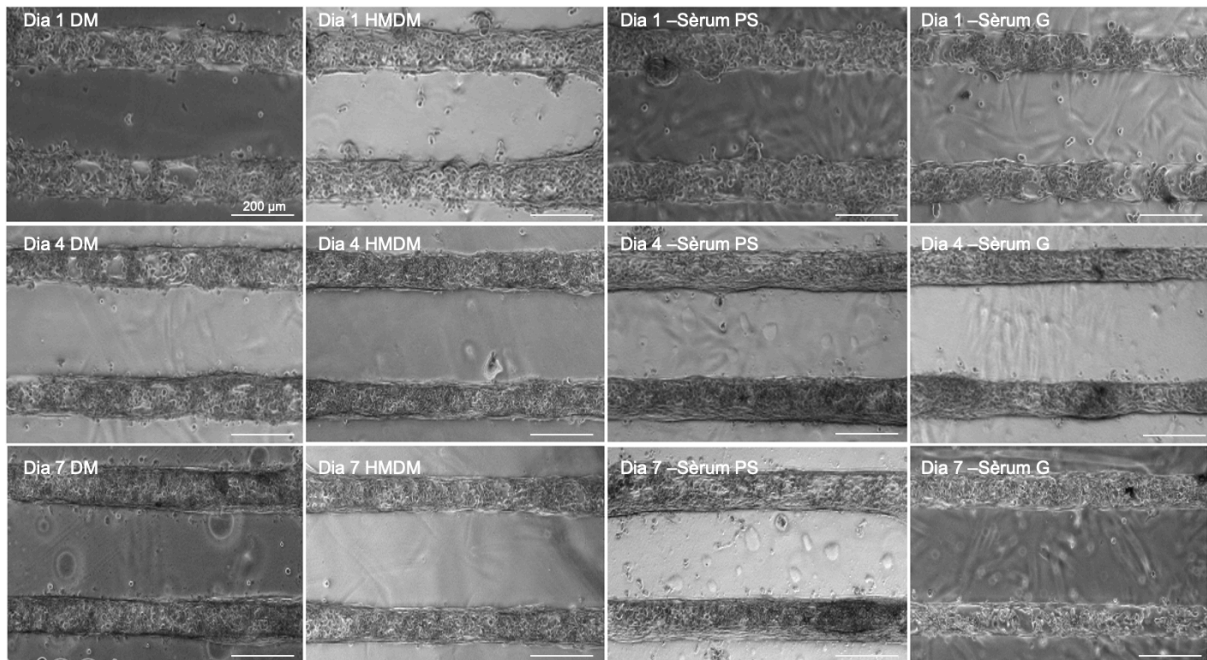
Les fibres ràpides estan dotades d'una potent maquinària contràctil degut principalment a diferències d'isoformes de miosina MYH 1, MYH2 i MYH4, així que si s'expressa aquest gen vol dir que les cèl·lules han començat a activar la maquinària contràctil. En les fibres lentes hi ha expressió de MYH 7 i TNNT1. El gen ACTN 2 codifica per proteïnes sarcomèriques i el TTN per proteïnes abundants en el múscul estriat. En canvi el gen MYOG s'expressa abundantment al principi del procés de diferenciació però a poc a poc baixa el seu nivell d'expressió.

Tenint en compte tots aquests aspectes, en primer lloc podem concloure que el medi DM, sembla ser el menys efectiu de tots, té el menor nivell d'expressió en tots els casos. Pel que fa als altres medis, si observem l'expressió de MYH 1, MYH 2 i MYH 4 veiem que en tots ells els nivells són elevats, per tant els mioblasts s'han diferenciat i han format miotubs. Si ens fixem en els gens que codifiquen gens pel teixit sarcomètic ACTN 2 i TTN, podem veure que els millors resultats estan una mica repartits, en el medi HMDM i - Sèrum G hi ha una major quantitat d'ACTN 2, en canvi en el cas de

TTN són els medis -Sèrum qui presenten més expressió. Per últim esperàvem baixos nivells de MYOG en teixits amb els miotubs més diferenciats, a l'observar els resultats veiem que en el medi -Sèrum G hi ha alts nivells d'expressió d'aquest gen. Si tenim en compte els resultats de la il·lustració 9 B, podem determinar que la diversitat de mida de les cèl·lules en aquest medi és molt gran, és a dir que conviuen diferents poblacions, en la resta de medis, la població de cèl·lules és més homogènia. Si ens centrem en el medi -Sèrum PS els nivells d'expressió són molt baixos, es a dir que amb el mateix temps el teixit està en una etapa més tardana de la diferenciació cosa que es confirma amb els nivells elevats de TTN.

### Estudi funcional en diferents dels medis de diferenciació en 3D

També vam realitzar l'experiment en 3D utilitzant una concentració de  $1.2 \cdot 10^6$  cèl·lules per pou i una concentració del 5% GelMA i 0.5% CMC els motlles utilitzats tenien una amplada de 150  $\mu\text{m}$ . 24 h després de l'encapsulació i després de comprovar que la confluència era la adequada va reemplaçar el GM pels diversos medis de diferenciació ( DM, HMDM, -sèrum PS i -sèrum G). L'evolució dels cultius es mostra a la il·lustració 11.

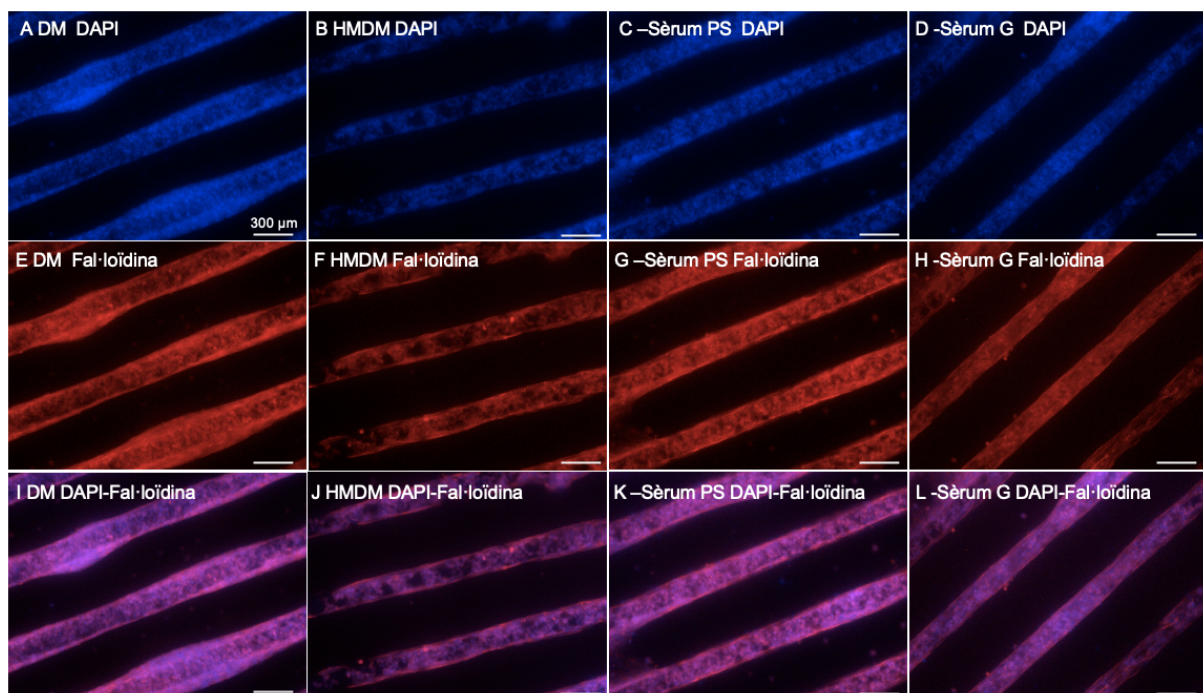


Il·lustració 11. Micrografia de contrast de fases de mioblasts humans en cultiu 3D durant el protocol de diferenciació. Les cèl·lules tenen una concentració de  $1.2 \cdot 10^6$  [cèl·lules/pou]. La primera fila correspon al dia 1 de diferenciació, la segona al dia 4 i la tercera a dia 7. La primera columna mostra l'evolució del medi DM, la segona HMDM, la tercera -sèrum PS i la quarta -Sèrum G.

Observant la morfologia dels diferents cultius a dia 7, vam veure que en tots ells s'havien format miotubs, tot i això en els quatre casos, es poden observar cèl·lules

amb forma d'esfera a la part interior dels canals. Creiem que això pot ser degut per un error puntual en el moment de l'encapsulació, segurament amb el fotoiniciador el qual hauria endurit massa el material.

Per tal avaluar si realment s'havien fusionat les cèl·lules vam realitzar una tinció fluorescent DAPI que marcarà de color blau els àcids nucleics i Fal·loïdina, la qual marcarà de color vermell és citoplasma de les cèl·lules (vegeu la tinció a la il·lustració 12). Analitzant les imatges vam poder confirmar que tot i que no s'havien format molts miotubs, les cèl·lules sí que s'havien emigrat a la part externa dels canals i allà s'havien diferenciat.



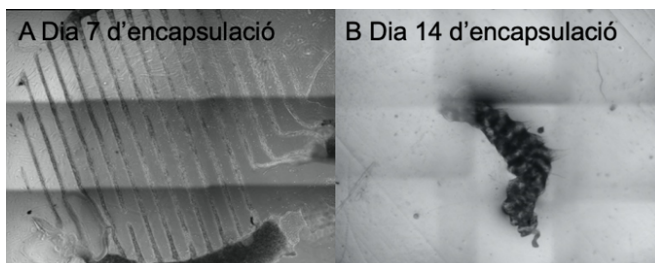
*Il·lustració 12. Micrografia de fluorescència de mioblasts humans en cultiu 3D a dia 7 de diferenciació. Les cèl·lules tenen una concentració de  $1.2 \cdot 10^6$  [cèl·lules/pou]. La primera fila correspon al dia 1 de diferenciació, la segona al dia 4 i la tercera a dia 7. La primera columna mostra l'evolució del medi DM, la segona HMDM, la tercera -sèrum PS i la quarta -Sèrum G.*

Per acabar vam realitzar un estudi funcional dels cultius on s'analitzaven el moviment dels ions de calci durant l'estimulació elèctrica. Després d'aplicar el kit de calci vam estimular el cultiu aplicant  $10 \text{ V/cm}^2$  durant 1 ms i freqüències Hz (2 Hz, 1 Hz i 0,5 Hz) dins la cabina del microscopi. En aquest cas només van respondre dos dels quatre cultius, el HMDM i el -Sèrum PS. Com hem pogut demostrar, després de 7 dies de diferenciació no s'aconsegueixen miotubs madurs amb el medi DM, pel que fa al -Sèrum G sembla que tot i haver-hi miotubs molt grans encara no eren massa madurs. Amb l'ajut d'aquest instrument, vam poder observar un lleuger moviment de

contracció en els miotubs més desenvolupats durant l'estimulació. En el vídeo 3, (<https://youtu.be/OC1Ujm5PkrE>) s'observa com respon els miotubs diferenciats amb el medi HMDM a l'estimulació elèctrica de 10 V/cm<sup>2</sup> durant 1 ms i freqüències 2 Hz. En el vídeo 4 (<https://youtu.be/VXaxtg26A5Q>) s'observa com respon els miotubs diferenciats amb medi -Sèrum PS a l'estimulació elèctrica de 10 V/cm<sup>2</sup> durant 1 ms i freqüències 1 Hz.

### **Estudi de la viabilitat del cultiu 3D**

L'estudi anterior es va repetir exactament igual, amb la intenció de determinar quan temps aguantava l'estructura tridimensional. L'objectiu inicial era comprovar si hi havia diferències significants analitzant els miotubs després de 7 dies de diferenciació o més tard. El resultat va ser el mateix en els quatre casos 14 dies després de l'encapsulació el material es va compactar i va perdre tota l'estructura, creiem que això potser degut a la pèrdua de l'adherència del PGDA amb el cristall, si la pel·lícula de PGDA s'aixeca el cultiu 3D, perd tots els punts de suport, això fa que el material es compacti formant una pilota de GelMA, CMC, cèl·lules i PEGDA. Veure l'evolució del cultiu a la il·lustració 13. Si en algun cas interessa mantenir els cultius tridimensionals més temps, es podrien estudiar altres materials d'adhesió.



*Il·lustració 13. Micrografia de contrast de fases, la imatge A mostra l'estructura del cultiu 7 dies després de l'encapsulació, la fotografia B, mostra l'estructura després de 14 dies després de l'encapsulació.*

## Conclusió

Després d'aquests estudis podem dir que sí que és possible sintetitzar un cultiu tridimensional que representi la fisiologia del teixit muscular a partir de mioblasts de pacients humans. Després de veure els resultats podem dir que tots els objectius establerts s'han superat amb èxit.

- S'ha determinat la composició del material on els mioblasts es desenvolupen millor, GelMA 5% i CMCMA 0.5%.
- L'estructura havia de ser canals, ja que aquesta forma facilita la diferenciació dels mioblasts en miotubs, i perquè això passi l'amplada òptima dels canals és 150  $\mu\text{m}$ .
- S'ha determinat que sabem la concentració de cèl·lules ha de ser  $1.2 \cdot 10^6$  cèl·lules per encapsulació.
- S'ha demostrat que el medi -Sèrum PS és més adequat per la diferenciació dels mioblasts cap a miotubs.
- S'ha estudiat la viabilitat del cultiu i sabem que en aquestes condicions el material manté les propietats estructurals 10 dies.
- Pel que fa a l'anàlisi funcional, hem determinat que cal una estimulació de  $10\text{V}/\text{cm}^2$  per tal que les cèl·lules responguin a aquest estímul.
- S'ha demostrat que hi ha miotubs madurs que encara no són capaços de realitzar moviments contràctils però que sí que respondre al flux dels ions de calci.

En aquest treball hem posat a punt el cultiu 3D que en un futur anirà a l'interior d'un xip que serà capaç d'analitzar el microambient, a la vegada que determinarà si un fàrmac funciona. Comentar, que aquest projecte farà possible fer un cribratge tridimensional, més realista i a la vegada reduirà l'ús d'animals d'experimentació durant la fase preclínica.

Personalment penso que els òrgans en xip aviat es convertiran en una plataforma imprescindible per al descobriment de nous fàrmacs.

## Autoavaluació

Sempre he pensat que el treball de final de grau, no només posa a prova els coneixements apresos durant la carrera, sinó que també posa a prova les habilitats i sobretot el criteri i pensament científic que sense adonar-nos hem anat formant durant aquest temps, i així ha sigut.

En un laboratori res surt bé a la primera, però aquest treball m'ha demostrat que això no és dolent, més aviat el contrari. Els errors et fan posar en dubte tot el sistema i fan que et plantejis coses que fins al moment donaves per segures. Així que ara entenc perquè diuen que d'on se n'aprèn és dels errors no els encerts.

En l'àmbit personal, des del primer moment m'he sentit molt còmode amb l'equip i això ha fet que hagi après moltíssim durant la meva estada. He realitzat moltes tasques que mai havia fet, i ara puc dir que sóc capaç de portar un cultiu cel·lular jo sola, però tenint clar que un científic sempre va acompanyat d'un equip.

Si la ciència de per si ja és prou incerta, el que encara ho ha fet més ha estat la pandèmia de la Covid-19. Han estat mesos d'inquietud i d'incertesa, però el que he après de tot això, és que per molt que ho vulguis tenir tot controlat, hi ha ocasions on el futur no depèn de tu. Va haver-hi una època en la qual no sabíem si podríem tornar als laboratoris, per sort i vam poder tornar, però amb moltes restriccions horàries i d'aforament, cosa que limitava molt el dia a dia experimental. Tot això seguit d'un estiu que tothom estava esperant, i a l'estiu les empreses fan vacances i els reactius no arriben! Però tot això m'ha fet reinventar, canviar i plantejar nous experiments dia rere dia. Però de les adversitats també se n'aprèn i puc dir que tenien en compte tot el que ha passat estic molt contenta, ja que d'aquest treball n'he après molt més que biotecnologia.

## Bibliografia

1. Sobre nosotros - Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC). Available at: <http://www.ibebarcelona.eu/es/sobre-nosotros/>. (Accessed: 29th June 2020)
2. Biosensors per a bioenginyeria - Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC). Available at: <http://www.ibebarcelona.eu/biosensors>. (Accessed: 29th June 2020)
3. Stern-Straeter, J. *et al.* Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering. *Int. J. Mol. Med.* **21**, 49–56 (2008).
4. Ortega, M. A. *et al.* Muscle-on-a-chip with an on-site multiplexed biosensing system for: In situ monitoring of secreted IL-6 and TNF- $\alpha$ . *Lab Chip* **19**, 2568–2580 (2019).
5. Eberli, D., Soker, S., Atala, A. & Yoo, J. J. Optimization of human skeletal muscle precursor cell culture and myofiber formation in vitro. *Methods* **47**, 98–103 (2009).
6. Juhas, M. & Bursac, N. Roles of adherent myogenic cells and dynamic culture in engineered muscle function and maintenance of satellite cells. *Biomaterials* **35**, 9438–9446 (2014).
7. Mishra, S. K. *et al.* 'Dystrophia Myotonica' and the legacy of hans gustav wilhelm steinert. *Annals of Indian Academy of Neurology* **21**, 116–118 (2018).
8. Bird, T. D. Myotonic Dystrophy Type 1. (2019).
9. DMPK DM1 protein kinase - Gene - GTR - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/genes/1760/>. (Accessed: 7th July 2020)
10. Distrofia miotónica tipo 1 | Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD) – an NCATS Program. Available at: [https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/12523/distrofia-miotonica-tipo-1#ref\\_3041](https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/12523/distrofia-miotonica-tipo-1#ref_3041). (Accessed: 18th May 2020)
11. García-Lizarriar, A. *et al.* Composite Biomaterials as Long-Lasting Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. *Macromol. Biosci.* **18**, (2018).
12. Sulfoxid de dimetil (DMSO): una revisió - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3510103/>. (Accessed: 1st July 2020)

13. P, O. *et al.* Fabrication of 3D Cell-Laden Hydrogel Microstructures Through Photo-Mold Patterning. *Biofabrication* **5**, (2013).
14. Cells, M. Chapter 2. **1889**, 17–24 (2019).
15. Mestre, R. *et al.* Force Modulation and Adaptability of 3D-Bioprinted Biological Actuators Based on Skeletal Muscle Tissue. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1800631 (2018).
16. 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).
17. Guo, X. *et al.* In vitro differentiation of functional human skeletal myotubes in a defined system. *Biomater. Sci.* **2**, 131–138 (2014).
18. Morgan, J. & Partridge, T. Skeletal muscle in health and disease. *DMM Disease Models and Mechanisms* **13**, (2020).
19. Mukund, K. & Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **12**, (2020).