

# XIPS MICROFLUÍDICS:

LA REVOLUCIÓ MÈDICA DEL S.XXI  
I L'ESPERANÇA PER LA CURA DE L'ELA

**MARIE SEGPEL**  
Treball de Recerca

Curs: 2n de Batxillerat  
Any acadèmic: 2021-2022



“Res en aquest món ha de ser temut..., només entès. Ara és el moment de comprendre més, per a que puguem témer menys.”

*Marie Curie*

“No entens realment alguna cosa almenys que siguis capaç d’explicar-li a la teva padrina.”

*Albert Einstein*

## **AGRAÏMENTS**

Aquest treball de recerca no hagués estat possible sense l'ajuda de tot un seguit de persones i per aquest motiu els vull donar les gràcies.

Primer de tot, gràcies a la meva família per la seva implicació i pel seu suport incondicional, aportant idees per fer créixer el treball, impulsant-me a desenvolupar-lo i proporcionant-me tots els mitjans necessaris per dur-lo a terme.

Gràcies, també, al programa Bojos per la Ciència i al grup de Bioenginyeria per poder formar part d'aquesta experiència única i tant enriquidora. Sobretot als investigadors Juanma Fernández, Júlia Sala i Júlia Rodríguez del grup Biosensor for bioengineering de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) per creure en mi i per la seva orientació, ajuda i assessorament constant.

Per últim, però no menys important, vull agrair a la meva tutora la seva tutorització i la seva disponibilitat al llarg de tot el procés. Al professorat de l'institut, que fa un any em van ajudar a presentar la meva candidatura al programa Bojos per la Ciència.

## RESUM

L'objectiu d'aquest treball de recerca és donar resposta a les dues preguntes d'investigació plantejades. La primera, de caràcter teòric, és: poden els xips microfluídics modelar la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica? La segona, de caràcter pràctic, és: quin hidrogel resulta més apropiat per fixar-hi cèl·lules musculars esquelètiques per tal d'elaborar un model in vitro de la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica? Un altre objectiu és donar visibilitat a la part més humana d'aquesta malaltia.

Per respondre a la primera qüestió es va fer recerca d'articles científics publicats a la Biblioteca Nacional de Medicina. Per respondre la segona qüestió es va realitzar un experiment al laboratori per comparar l'efectivitat de dos hidrogels formats amb materials biocompatibles diferents. Per visibilitzar aquesta malaltia es va elaborar un documental.

Segons els resultats obtinguts en aquest treball de recerca, es pot modelar l'esclerosi lateral amiotròfica mitjançant els xips microfluídics. D'acord amb el test desenvolupat en aquest estudi s'ha conclòs que l'hidrogel format per GelMA és més adient per a les fibres musculars comparat amb el format per PEGDA.

*Paraules clau:* esclerosi lateral amiotròfica, hidrogels, modelatge, xips microfluídics.

## ABSTRACT

The objective of this research project is to answer the two research questions raised. The first, within a theoretical approach, is: can microfluidic chips model amyotrophic lateral sclerosis disease? The second, within a practical approach, is: which hydrogel is the most appropriate to fix skeletal muscle cells in order to adapt an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis disease? Another objective is to give visibility to the most human part of this disease.

To answer the first question, research was carried out on scientific articles published in the National Library of Medicine. To answer the second question, an experiment was carried out in the laboratory to compare the effectiveness of two hydrogels formed with different biocompatible materials. To make this disease visible, a documentary was made in this project.

According to the results obtained in this research work, amyotrophic lateral sclerosis can be modelled using microfluidic chips. According to the test developed in this study, it has been concluded that the hydrogel formed by GelMA is more suitable for muscle fibers compared to the PEGDA format.

*Keywords:* amyotrophic lateral sclerosis, hydrogels, modelling, microfluidic chips.

# ÍNDEX

INTRODUCCIÓ .....	9
1. LA TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA.....	12
1.1. Introducció a la microfluídica.....	12
1.2. Usos de la microfluídica .....	12
2. ELS XIPS MICROFLUÍDICS.....	13
2.2. Què són.....	13
2.3. Usos dels xips microfluídics.....	13
3. ORGAN-ON-A-CHIP.....	14
3.1. Què són i quines funcions desenvolupen.....	14
3.2. Objectius i finalitat .....	14
3.3. Com ho fan .....	15
3.4. Estructura de l'OOAC .....	16
3.5. Producció i fabricació .....	16
3.5.1. Principals components i aspectes a tenir en compte .....	17
3.5.2. Mètodes de fabricació .....	18
3.6. Avantatges i beneficis que aporten.....	19
3.6.1. Estudis preclínics fins avui dia.....	19
3.6.2. Estudis preclínics alternatius.....	20
3.6.3. El futur en els assajos clínics.....	22
3.7. Utilitats i aplicacions .....	23
3.7.1. Diagnòstic.....	23
3.7.2. Testatge i detecció de la toxicitat dels medicaments.....	24
3.7.2.1. Mètode per guiar els fàrmacs .....	25
3.7.3. Investigacions de l'angiogènesi .....	25
3.7.4. Sistemes de suport d'òrgans bioartificials.....	25
3.7.5. L'impacte de les nanopartícules.....	26
3.7.6. Teràpies per a malalties minoritàries .....	26
3.8. Tipus d'òrgans modelats mitjançant OOAC .....	26
3.9. Problemes de les aplicacions pràctiques.....	30
3.9.1. Reptes biològics .....	30
3.9.2. Reptes tecnològics.....	30



4.	ESCLEROSI LATERAL AMIOTRÒFICA .....	31
4.1.	Què és l'Esclerosi Lateral Amiotròfica .....	31
4.2.	Mecanismes patològics.....	32
4.3.	Components del teixit neuromuscular afectats per l'ELA.....	33
4.3.1.	Interaccions entre cèl·lules en el SNP .....	34
4.3.2.	Les neurones motores.....	34
4.3.3.	Síntesi local de proteïnes en axons motors espinals.....	35
4.3.4.	Les cèl·lules o fibres musculars .....	35
4.3.5.	El paper de les cèl·lules i coanòcits terminals de Schwann a la NMJ .....	35
4.3.6.	Unitat neurovascular/Unitat funcional BBB .....	36
4.3.7.	Matriu extracel·lular (ECM) .....	36
5.	MODELATGE DE L'ELA MITJANÇANT XIPS MICROFLUÍDICS .....	38
5.1.	Aspectes a tenir en compte per a la fabricació d'un xip optimitzat.....	38
5.1.1.	Models 3D basats en hidrogel .....	38
5.1.2.	La formació de circuits neuronals .....	39
5.1.3.	Factors bioquímics i mecànics a tenir presents .....	40
5.2.	Modelar la NMJ d'ELA.....	40
5.2.1.	Evidències de patologia precoç de la NMJ en ELA.....	41
5.2.2.	Xip microfluídic per estudiar la fisiologia en la NMJ.....	41
5.2.2.1.	Disseny i fabricació d'un xip .....	41
5.2.2.2.	Models de NMJ derivats del pacient i generats per iPSC .....	43
6.	PRÀCTICA EXPERIMENTAL AL LABORATORI .....	45
6.1.	Objectius.....	45
6.2.	Pregunta d'investigació .....	45
6.3.	Marc teòric.....	45
6.4.	Materials .....	47
6.5.	Equipament.....	48
6.6.	Reactius .....	48
6.7.	Dissolucions/Solucions.....	48
6.8.	Procediment .....	48
6.9.	Registre dels resultats obtinguts .....	49
6.10.	Anàlisi dels resultats i conclusions .....	52
7.	CONCLUSIONS.....	54

8. BREU EXPLICACIÓ PER A QUÈ HO ENTENGUI LA PADRINA.....	55
9. DOCUMENTAL: <i>MIRANT EL QUE NINGÚ VOL VEURE</i> .....	57
9.1. Introducció.....	57
9.2. Objectius.....	57
9.3. Metodologia.....	57
9.4. Presentació.....	58
GLOSSARI .....	59
BIBLIOGRAFIA.....	61
WEBGRAFIA .....	63
FOTOWEBGRAFIA.....	66
ANNEXOS.....	70



## INTRODUCCIÓ

El tema d'aquest treball de recerca és la utilització dels xips microfluídics per a futurs avenços en la investigació de la cura de la malaltia anomenada Esclerosi Lateral Amiotròfica coneguda per les seves sigles com ELA. Una malaltia neuromuscular degenerativa, actualment incurable i mortal.

L'objectiu d'aquest treball de recerca és donar resposta a les dues preguntes d'investigació plantejades. La primera, de caràcter teòric, és: poden els xips microfluídics modelar la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica? La segona, de caràcter pràctic, és: quin hidrogel resulta més apropiat per fixar-hi cèl·lules musculars esquelètiques per tal d'elaborar un model in vitro de la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica en un xip microfluídic? Un altre objectiu és donar visibilitat a la part més humana d'aquesta malaltia.

Les motivacions personals que m'han empès a dur a terme aquesta investigació han estat diverses. En primer lloc la meua participació al programa Bojos per la Ciència amb el grup de Bioenginyeria m'ha permès obrir nous horitzons i m'ha aportat la coneixença d'innovadors avenços en el camp de la ciència. Els quals m'han despertat "curiositat científica" i moltes ganes d'aprendre. Particularment també em van proporcionar el contacte amb els investigadors i investigadores del grup de *Biosensors for biengineering* de l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) que actualment porten a terme diversos estudis i experiments molt interessants i prometedors en el camp dels xips microfluídics, aplicats al teixit neuromuscular amb l'objectiu d'estudiar les malalties que l'afecten. En segon lloc el que m'ha impulsat a escollir en concret la malaltia de l'ELA, ha estat la seva rellevància, no sols a nivell científic, sinó també a nivell social. Així com també la repercussió que ha tingut aquesta malaltia en el meu entorn. Malauradament l'ELA està catalogada com una malaltia minoritària. Això fa que no s'inverteixin els diners ni el temps suficients per al seu estudi. Tot i que això és qüestionable, ja que la poca prevalença dels pacients d'ELA fa que no hi hagi un registre precís del número de casos afectats per la malaltia. Doncs cada dia a Espanya es moren 3 pacients i se'n diagnostiquen 3 més.

A nivell científic penso que és una manera d'aportar el meu granet de sorra en la investigació d'aquesta malaltia devastadora, mortal i actualment incurable. Ja que tampoc hi ha cap sistema terapèutic que ajudi a aturar la seva progressió, ni tan sols entenem al 100% el seu complex mecanisme patològic. A nivell social també considero que és interessant. Per això he dedicat i guardat un raconet en aquest treball per a donar veu a la malaltia i fer en gran part, divulgació a través d'un audiovisual.

El treball consta de tres parts diferenciades. La primera és la part teòrica, en la qual fem una breu introducció al camp de la tecnologia microfluídica explicant que és i els seus usos. Dins de les seves utilitats hi trobem la fabricació de xips microfluídics i més concretament els Organs-on-a-Chip (OOAC), dels quals en fem una descripció de les seves característiques, el seu funcionament, la seva fabricació, els avantatges i beneficis que aporten i les seves utilitats i aplicacions. Per últim, ens plantegem si és possible la modelització de la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) mitjançant xips microfluídics.

La segona part consisteix en la part pràctica i per tant en un experiment desenvolupat al laboratori. Es tracta d'un estudi comparatiu entre dos hidrogels composts per dos materials biocompatibles diferents. Un està format per LAP+GelMA i l'altre està format per LAP+PEG. Amb l'objectiu d'investigar quin constitueix una estructura més adient per a integrar, fixar, alinear, dirigir, i fer créixer les cèl·lules o fibres musculars esquelètiques. Les quals es veuen afectades per l'ELA i són un element fonamental a l'hora de modelar aquesta malaltia in vitro en un xip microfluídic. El qual ens permetria estudiar la malaltia de l'ELA in vitro, comprendre-la, poder dissenyar noves estratègies terapèutiques i testar possibles candidats a fàrmacs. La tercera i última part, és un documental, en el qual persones que s'han topat amb la malaltia narren les seves vivències i els seus coneixements, amb l'objectiu de donar-li visibilitat i conscienciar, així, a la societat.

La metodologia seguida ha estat pel que fa al marc teòric, la consulta a la web PubMed (Biblioteca Nacional de Medicina) i també la recerca d'informació a través del grup d'investigació de l'IBEC que m'ha assessorat durant la meua recerca científica i m'ha tutoritzat el TDR mitjançant les seves sessions teórico-pràctiques i alguns articles que han publicat d'experiments que han desenvolupat. Referent a la part pràctica vaig visitar un dia els laboratoris de l'IBEC on em van fer

tota l'explicació dels passos i les tècniques que havia d'utilitzar per a dur a terme l'experiment. Per últim em van donar els materials i reactius necessaris i que requeria la pràctica duta a terme al laboratori de l'institut amb la meva tutora. Finalment, per l'edició de l'audiovisual he fet servir l'aplicació OpenShot i els coneixements adquirits a l'assignatura de música i cinema que vaig cursar a 4t d'ESO.

# 1. LA TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA

## 1.1. Introducció a la microfluídica

La tecnologia microfluídica va sorgir a principis de la dècada dels 80 i permet la manipulació i el control precís del comportament de fluids geomètricament restringits a una escala tant ínfima fins arribar als picòmetres en una xarxa de microcanals. També ens permet la manipulació de diverses reaccions bioquímiques a volums molt reduïts. Inclús proporciona una manera de simular gradients químics espaciotemporals, forces mecàniques dinàmiques i interfícies de teixits crítics mitjançant la manipulació de fluids a nivells micro. A més, ens permet controlar formes i mides de característiques superficials a escala de nm a  $\mu\text{m}$ . Treballar en aquestes escales infinitesimals ofereix nombrosos avantatges com que els assajos amb microfluídica són més segurs ja que les substàncies tòxiques utilitzades al laboratori es poden manipular de forma més controlada i continguda.

La microfluídica és un camp interdisciplinari que inclou: la enginyeria, la física, la química, la bioquímica, la nanotecnologia i la biotecnologia.

## 1.2. Usos de la microfluídica

L'ús de la microfluídica abarca des del desenvolupament de capçals d'injecció de tinta, fins a diverses aplicacions en el camp de la medicina. Aquestes últimes ens permeten dissenyar i fabricar xips microfluídics que consisteixen en el modelatge de diferents miniòrgans i malalties humanes per tal d'estudiar-les.

## 2. ELS XIPS MICROFLUÍDICS

### 2.1. Què són

Els xips microfluídics es basen en la tecnologia microfluídica i l'enginyeria de teixits. Els podem classificar en:

- *Lab-on-a-chip* quan són plataformes microfluídiques integrades per realitzar múltiples processos de laboratori en un sol xip.
- *Organ-on-a-chip* quan fa referència al modelatge d'un miniòrgan.
- *Disease (o malaltia)-on-a-chip* quan fa referència al modelatge d'una malaltia.
- *Human-on-a-chip* quan fa referència a un conjunt de xips connectats i que interaccionen entre ells per modelar els principals òrgans del cos humà.

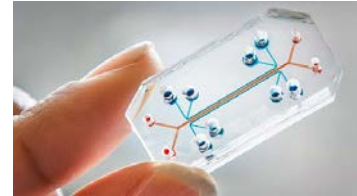


Figura 1. Xip microfluídic.



Figura 2. Xip microfluídic.

Aquestes plataformes s'han plantejat a partir de diferents disciplines que han contribuït al seu desenvolupament: la microelectrònica, la biologia molecular i l'anàlisi química.

Aquests xips integren la preparació de mostres, les reaccions, la separació, la detecció i les unitats operatives bàsiques, com ara el cultiu cel·lular, la classificació i la lisi cel·lular.

### 2.2. Usos dels xips microfluídics

Els dispositius microfluídics els podem utilitzar per dur a terme reaccions i anàlisis químiques i biològiques miniaturitzades, automatitzades, integrades i paral·lelitzades. I que ens poden oferir un rendiment més barat, més ràpid, controlable i superior en els assaigs bioquímics en comparació amb les proves de laboratori convencionals.

Aquestes reaccions tenen lloc en microcanals i microestructures, que es fabriquen mitjançant tecnologia de microfabricació de semiconductors com la fotolitografia i la softlitografia. Les plataformes de xips basats en cultius cel·lulars microfluídics ofereixen la possibilitat de crear gradients bioquímics de metabòlits, factors solubles, citoquines i altres molècules al microambient cel·lular.

## 3. ORGAN-ON-A-CHIP

### 3.1. Què són i quines funcions desenvolupen

L'*Organ-on-a-chip* (OOAC) es troba a la llista de les deu principals tecnologies emergents i fa referència a un sistema biomimètic d'òrgans fisiològics construït sobre un xip microfluídic. Un OOAC es pot definir com un dispositiu que conrea una disposició de cèl·lules en perfusió contínua basat en microfluids que allotja un (co) cultiu de cèl·lules *in vitro* i pretén recapitular estructures específiques, funcions i aspectes clau del metabolisme humà d'un determinat teixit o òrgan en fisiologia normal o patològica. Simulant en tot moment un microambient igual al de l'òrgan humà real. Això s'aconsegueix mitjançant una combinació de biologia cel·lular, enginyeria i tecnologia biomaterial.

Un OOAC es basa en el desenvolupament de tres components principals: la font de cèl·lules, la tecnologia de xips i el descobriment de biomarcadors.

Els OOAC tenen la capacitat de regular paràmetres clau, inclosos els gradients de concentració, la força de tall, l'estructura cel·lular, els límits del teixit, el teixit i les interaccions orgàniques, en un xip.

### 3.2. Objectius i finalitat

Aquesta tècnica té com a objectiu imitar i emular l'arquitectura i la funcionalitat cel·lular organotípica clau, la matriu extracel·lular 3D (ECM), els factors bioquímics i les indicacions biofísiques a petita escala. Reiterant o imitant gradualment les complexes estructures a nivell de teixit-òrgan, la fisiologia cel·lular, la compartimentació i la interconnexió de les plataformes d'òrgans humans.

La seva finalitat és desenvolupar models microfisiològics integrats eficaços i traduïbles per investigar els esdeveniments fisiològics que caracteritzen la interacció entre òrgans, sistema immunitari i estímuls exògens (per exemple, farmacèutics i nutracèutics) en estats de salut i malaltia.

En definitiva, les plataformes OOAC són una nova generació de models de cultiu cel·lular en 3D que emulen millor les propietats dinàmiques, fisicoquímiques, bioquímiques i microarquitecturàries del microentorn dels òrgans vius.

### 3.3. Com ho fan

Aquestes plataformes de cultiu cel·lular microfluídic recapitulen o copien el microambient cel·lular, les interaccions de la interfície teixit-teixit i cèl·lula-cèl·lula, gradients espaciotemporals, bioquímics i propietats biomecàniques d'un òrgan viu, d'un teixit humà específic o d'una xarxa d'òrgans funcionals *in vitro* perquè serveixi per al modelatge de la malaltia i el cribratge de medicaments.

L'OOAC permet rastrejar els senyals cèl·lula-cèl·lula / teixit-teixit de manera aïllada en una estructura simple o dins d'una estructura complexa amb un control espaciotemporal precís. I com a conseqüència, proporcionar una millor comprensió de la contribució d'un tipus de cèl·lula específica dins del medi, òrgan o teixit. Ja que aquests dispositius solen implicar alguna forma de compartimentació, ja sigui mitjançant la incorporació de membranes poroses, l'ús de pilars o la integració de guies de fase. Permentent així, estudiar la interacció entre components o estudiar un apartat concret.

Darrerament s'ha popularitzat la integració de cadafals 3D com ara matrius extracel·lulars sintètiques o naturals.

Totes aquestes tècniques permeten un control complet sobre el microentorn i permeten la interacció cèl·lula-cèl·lula i la interacció cèl·lula-matriu, així com el creixement i la migració de cèl·lules.

Com a tret diferenciatiu, en la metodologia convencional, les cèl·lules es cultiven en un entorn semiestàtic, on l'aplicació de compostos experimentals a les cèl·lules només depèn de la difusió. Tot el contrari que *in vivo*, ja que les cèl·lules obtenen oxigen i nutrients mitjançant el flux sanguini, a més de rebre estimulació química i estimulació física, com l'estirament i l'estrès tallant, de l'entorn que els envolta. Aquestes diferències entre *in vivo* i *in vitro* en morfologia i entorn podrien ser motius de pèrdua o desactivació de les funcions cel·lulars en cultius.



### 3.4. L'estructura de L'OOAC

L'estructura de l'OOAC es caracteritza per la complexa composició de diversos tipus de cèl·lules especialitzades disposades en geometries precises que condueixen a una interacció complexa entre les cèl·lules i el microentorn. Tot imitant *in vitro* l'heteroestructura cel·lular dins del sistema microfluídic.

L'ús d'aquesta tecnologia de microfabricació permet crear una estructura única amb l'escala desitjable i un control precís de les condicions químiques, físiques i de flux amb resolució espacial a escala cel·lular en un espai tridimensional.

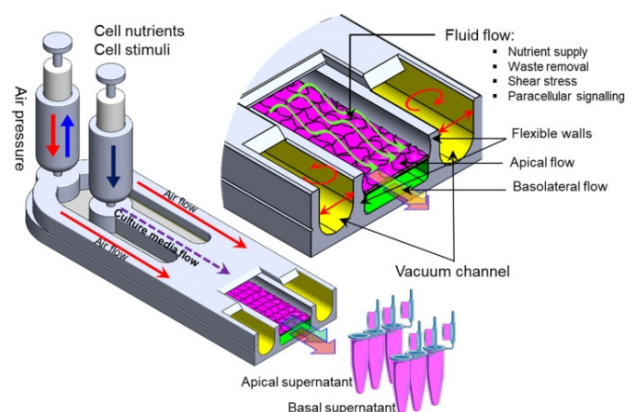
Per crear dispositius OOAC encara més rellevants, és important incloure xarxes vasculars als dispositius per garantir el subministrament d'oxigen i nutrients. El revestiment endotelial d'aquestes xarxes vasculars és extremadament important per imitar de manera realista la captació i distribució de nutrients o medicaments i, per tant, realitzar estudis de detecció farmacològica o toxicològica rellevants fisiològicament. Això esdevé encara més important per als estudis sobre el càncer i el modelatge predictiu de malalties, ja que la permeabilitat de la biomolècula, la captació de fàrmacs, el transport de tipus cel·lulars secundaris i el control dels nivells d'hidratació són marcadors importants de la teràpia.

### 3.5. Producció i fabricació

Com a primer pas en la planificació de la producció d'un OOAC, hem de tenir en compte la selecció de tipus de cèl·lules i biomaterials adequats per imitar el teixit d'interès desitjat. En particular, hem d'analitzar el tipus, l'origen i la distribució espacial de cèl·lules específiques de teixits estromals i parenquimàtics.

També hem de tenir en compte a l'hora de la seva fabricació d'introduir diversos materials funcionals que podem classificar-los a grans trets en materials inorgànics, orgànics i híbrids.

Actualment, els dispositius OOAC es fabriquen mitjançant la tècnica de litografia suau (tècnica que s'utilitza per fabricar estructures fetes amb materials elastomèrics). I utilitzant



**Figura 3.** Dibuix esquemàtic d'un simple dispositiu OOC amb funcions importants: perfusió de líquids, subministrament de nutrients, eliminació de residus, aplicació de força mecànica i mostreig aigües avall.

polidimetilsiloxà (PDMS) i hidrogels. Ja que són els materials de fabricació més comuns degut a les seves propietats de transparència òptica, que permeten obtenir imatges de cèl·lules vives, per la seva alta elasticitat, permeabilitat als gasos, la biocompatibilitat, la no toxicitat per a les cèl·lules i la capacitat de modelar propietats específiques dels òrgans.

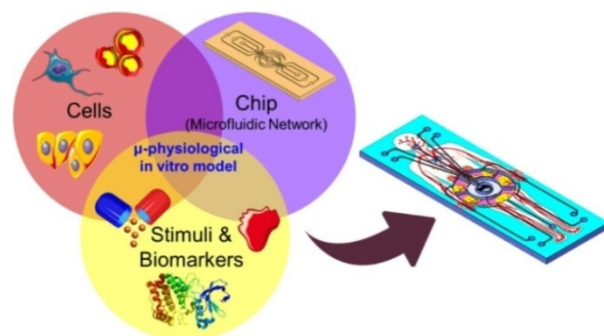
Com a tal, el xip té una mida compacta i conté microcanals que ens permeten controlar diversos paràmetres fluídics i químics, com ara velocitat de flux, pressió, oxigen i pH, proporcionant condicions de cultiu controlables. Això reflecteix les característiques microestructurals i funcionals *in vivo* dels teixits i òrgans humans, permetent així una investigació efectiva i precisa en medicina, biologia i farmacologia.

### 3.5.1. Principals components i aspectes a tenir en compte

En primer lloc el component biològic prevalent en molts dispositius OOAC és una interfície vascular que està present en tots els òrgans del cos humà. La vasculatura i la interfície vascular són particularment susceptibles a les forces biomecàniques, funcionen com a conductes per a les interaccions intercel·lulars i interòrgans i regulen el transport de medicaments i intercanvi de substàncies.

A més, la selecció de biomarcadors adequats és fonamental per a les proves de toxicitat de medicaments (o farmacològica) i l'alta expressió de biomarcadors en models *in vitro* reduirà el límit de detecció.

De fet, els dispositius OOAC comercialitzats han de ser plataformes de múltiples òrgans integrats amb diversos sensors (per exemple, sensors físics i electroquímics) per a la mesura en temps real i contínua de diversos paràmetres microambientals (per exemple, temperatura, pH, nivell d'oxigen, biomarcadors solubles, concentració de fàrmacs, etc.) que ofereixin una durabilitat d'almenys 7 o més dies d'assaig.



**Figura 4.** Els tres components principals dels OOAC: la font de cèl·lules, la tecnologia de xips i el descobriment de biomarcadors.

La integració d'un microscopi miniaturitzat en aquestes plataformes, proporciona un seguiment *in situ* dels canvis morfològics i ofereix una eina versàtil per a poder-les utilitzar en el camp clínic, biotecnològic i industrial farmacèutic.

La font de teixit biològic és un dels paràmetres més importants en el disseny d'OOAC. Els sistemes OOAC utilitzen cèl·lules, esferoides, organoides i biòpsies de teixits. Una eina prometedora són les cèl·lules mare, les quals es poden extreure dels humans sense biòpsia de teixits. Per definició, una cèl·lula mare és qualsevol cèl·lula que es pugui auto-renovar i que pugui diferenciar-se en un o més tipus de cèl·lules especialitzades. Els tipus més comuns inclouen cèl·lules mare embrionàries (ESC), cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) i cèl·lules mare adultes (ASC). Aquestes cèl·lules es poden utilitzar com a font de teixit biològic per a OOAC.

El component de detecció per obtenir i registrar dades pot ser un sensor de sortida de detecció incrustat o un sistema d'avaluació de funció visual basat en xips transparent.

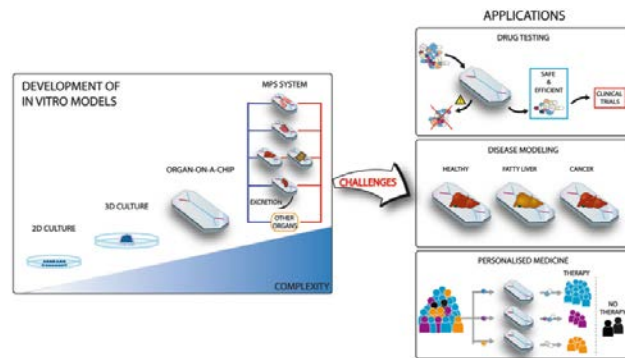
Per últim, un aspecte a tenir en compte és la tensió superficial. La poca quantitat de fluids en sistemes microflúidics i la gran proporció superfície / volum donaran lloc a interaccions superficials significatives. Per tant, la tensió superficial es fa més forta i dominant en aquests sistemes.

### **3.5.2. Mètodes de fabricació**

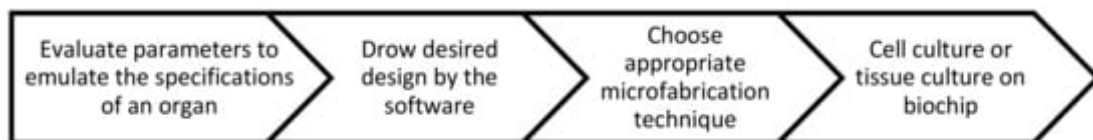
La implementació de mètodes avançats de fabricació additiva (per exemple, impressió 3D) o materials i mètodes de fabricació estàndard actuals (per exemple, modelatge per injecció i tall per làser), així com l'ús d'un format modular més estandarditzat amb materials biològicament inerts (per exemple, plàstics per substituir PDMS) resulten ser mètodes prometedors per fabricar dispositius OOAC. Amb els quals es poden preprogramar sofisticades arquitectures de teixits, bastides complexes o plantilles d'un dispositiu i imprimir-se automàticament amb alta fidelitat i controlabilitat.

Aquests petits models d'OOAC són atractius per la seva modularitat, les seves capacitats en 3D, la variabilitat en la construcció de diferents sistemes d'òrgans complexos i el fet de permetre la fabricació accelerada d'entorns d'òrgans comprovables. Hem revelat el potencial d'aquestes plataformes miniaturitzades per a diverses aplicacions en l'àmbit científic i hem trobat aplicacions generalitzades en diverses àrees de la ciència biomèdica. Inclouent diagnòstics, teràpies, lliurament de medicaments, biosensors i enginyeria de teixits.

Aquestes plataformes que tenen un gran potencial per avançar en la nostra comprensió sobre la fisiologia dels teixits i dels òrgans, ofereixen eines biomèdiques portàtils i rendibles per al modelatge de malalties, la investigació farmacèutica i la medicina personalitzada.



*Figura 5. Principals reptes en l'aplicació dels OOAC.*



*Figura 6. Procés general per fabricar una plataforma OOC microfluídica. El disseny, la microfabricació, el cultiu de teixits i els assaigs biològics són els principals passos per desenvolupar una plataforma microfluídica OOC per a proves biològiques o farmacèutiques.*

### 3.6. Avantatges i beneficis que aporten

#### 3.6.1. Els estudis preclínic fins avui dia

Els estudis preclínic majoritàriament es basen en eines tradicionals, és a dir, cultius de cèl·lules *in vitro* 2D o 3D, i models animals *in vivo*, per al desenvolupament de fàrmacs.

Fins avui dia i encara actualment, s'utilitzen les proves experimentals i el testatge amb animals per al cribatge preclínic en el procés de descobriment de fàrmacs. No obstant això, les errades en prediccions de l'eficàcia i la toxicitat causades per les diferències biològiques entre l'espècie humana i animal, com els mecanismes fisiològics i la seva complexitat, debiliten la precisió i la reproductibilitat dels resultats experimentals, fet que sovint provoca l'abandonament d'alguns compostos candidats abans dels assaigs clínics. Aquestes limitacions dels estudis *in vivo* de baix rendiment amb animals són la causa en gran mesura de la prolongació excessiva en el temps, de la baixa eficiència i de l'augment dels costos en el desenvolupament de nous fàrmacs. Sense deixar de banda altres inconvenients o desavantatges i no menys importants, com ara les consideracions ètiques.

Per resoldre aquests problemes, actualment s'han dissenyat proves de cultiu *in vitro* 2D amb cèl·lules d'origen humà com a alternativa a les proves amb animals. Aquests assaigs basats en

cèl·lules són un mitjà eficaç per al cribatge preliminar, com ara la citotoxicitat. Ja que ofereixen una manera ràpida i reproducible d'analitzar la resposta als fàrmacs; no obstant, els falta l'entorn de teixit fisiològic en 3D. Degut a això aquests mètodes tenen problemes, com per exemple que les cèl·lules cultivades amb plaques de Petri i plaques de diversos pous poden perdre notablement la seva capacitat de resposta i funció, i les interaccions entre òrgans no es poden avaluar directament.

Per tant, continua presentant dificultat predir amb exactitud l'eficàcia, la toxicitat i les interaccions dels òrgans. Ja que les cèl·lules cultivades en aquests sistemes sovint no conserven les seves funcions, morfologies i manifestacions fisiològiques d'òrgans o teixits originals. Tampoc aconseguen simular amb precisió les interaccions intraòrgans i els factors microambientals i sovint requereixen verificació en models animals *in vivo*. Segons les estimacions dels experts, evitar efectivament aquests errors comportaria un estalvi de costos i temps de fins al 50%.

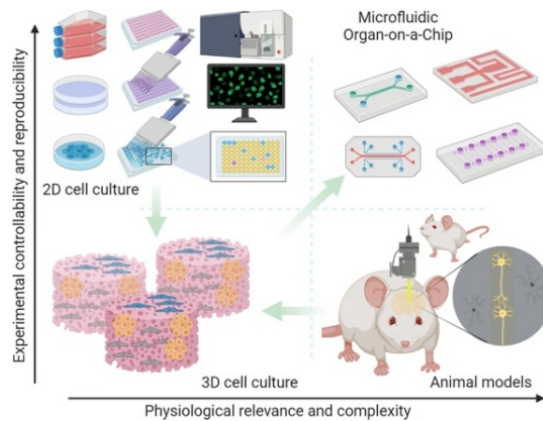
Per a casos emergents, com la pandèmia de la malaltia del coronavirus (COVID-19), es requereixen urgentment plataformes ràpides de detecció de medicaments per accelerar el desenvolupament de noves teràpies i vacunes. Per tant, això és una mostra que es necessiten amb urgència models alternatius de teixits amb fisiopatologia humana biomimètica per salvar la bretxa entre estudis en animals i assaigs clínics que impliquen subjectes humans en el desenvolupament de fàrmacs.

### 3.6.2. Estudis preclínics alternatius

En aquesta darrera dècada, s'ha apostat per la tecnologia dels OOAC. Aquesta ha estat àmpliament estudiada com a nou model d'òrgans *in vitro*. Atès que ens ofereixen la possibilitat d'imitar físicament i químicament l'ambient *in vitro*, es pot realitzar el manteniment de la funció i la morfologia cel·lular i la replicació de les interaccions d'òrgans. A més, també s'està treballant amb l'anomenat *Human-on-a-chip*, que integra funcions de múltiples òrgans en un sol dispositiu microfluídic per tal de predir les interaccions entre ells.

Aquestes senzilles plataformes ens permeten un cultiu cel·lular controlable dins d'un entorn microarquitectònic organotípic proporcionant més rellevància fisiològica per interrogar de forma controlada i sistemàtica la biologia humana.

Els recents avenços en enginyeria de teixits i microfabricació ens han permès amb aquests dispositius proporcionar una millora en l'expressió funcional i la maduració de les cèl·lules. Així com també una via per a sondejar esdeveniments que d'una altra manera serien difícils de visualitzar i estudiar. El model d'OOAC pot ajustar amb més precisió les condicions ambientals relacionades amb el creixement de la cèl·lula



**Figura 7.** Principals avantatges dels xips microfluídics.

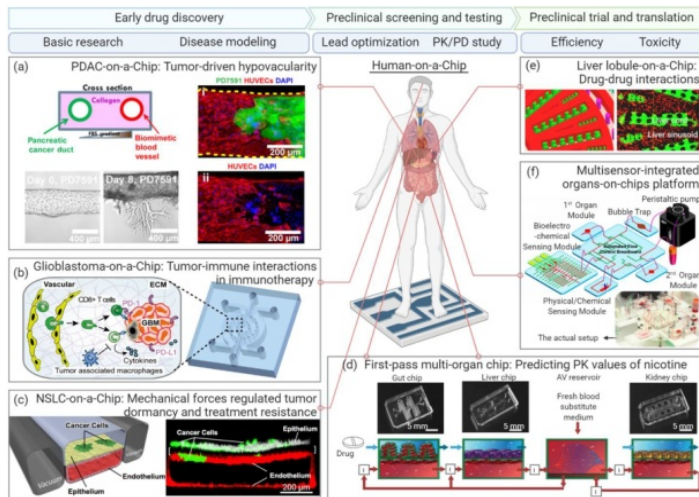
i la seva funció segons el tipus que cultiva. El cultiu del flux també ens permet controlar l'aportació de nutrients i eliminar els residus cel·lulars acumulats o metabòlits secundaris del medi de cultiu. A més, es pot regular el nivell d'oxigenació. Inclús, es pot fer que l'estrès tallant que apliquem garanteixi la integritat de la barrera de la capa cel·lular i poder, així, controlar la migració cel·lular *in vitro*.

A més de revelar la interacció i senyalització biològica, es poden aplicar els OOAC per estudiar les contribucions dels factors mecanobiològics a la progressió de la malaltia i a la resistència terapèutica. Pot servir de plataforma de modelatge alternatiu per ajudar a descobrir mecanismes patològics crítics, identificar biomarcadors i dianes terapèutiques per millorar els resultats de la malaltia. Ja que en les proves preclíniques, una descripció inadequada de l'entorn del teixit humà pot conduir a prediccions inexactes dels efectes combinats de la funció general del teixit.

En definitiva, la disponibilitat de models OOAC proporciona una gran quantitat d'oportunitats per comprendre la patogènesi<sup>1</sup> de malalties humanes i proporcionar un model potencialment millor per a la detecció d'un medicament, ja que aquests models utilitzen un entorn dinàmic en 3D similar al cos humà. Tot això és degut pel fet que en condicions fisiològiques, les cèl·lules resideixen en un entorn tridimensional (3D) i interactuen amb altres cèl·lules i la matriu extracel·lular (ECM). Aquestes interaccions són necessàries per a la correcta diferenciació i funció de les cèl·lules típiques, i imiten amb més precisió les condicions patològiques i fisiològiques del microambient.

<sup>1</sup> La patogènesi descriu l'origen, el desenvolupament i l'evolució d'una malaltia amb tots els factors que hi estan involucrats.

A més, les condicions de cultiu en 3D promouen una resposta millorada dels estímuls, l'expressió de gens i proteïnes i la funció cel·lular. Ja que les cèl·lules del cultiu 3D presenten una morfologia cel·lular, propietats mecàniques, diferenciació i viabilitat millorades.



**Figura 8.** Perspectives de futur en els assajos clínics amb xips microfluídics.

dels metabòlits dels medicaments. S'han fabricat i utilitzat OOAC per avaluar la toxicitat dels medicaments amb la correlació de dades amb l'assaig clínic. En conclusió, l'utilització de l'OOAC aporta molta més fiabilitat, ja que els assajos són realitzats en aquests sistemes tant afins i similars al cos humà. Fins i tot, es parla de medicina personalitzada per a cada pacient.

### 3.6.3. El futur en els assajos clínics

Les funcions tecnològiques de les futures plataformes OOAC, tal i com hem esmentat anteriorment, permetran el manteniment i el seguiment dinàmic *in situ* en temps real d'una àmplia gamma de paràmetres biològics, com ara l'estrès tallant, el pH, l'oxigen, les citosines i les quimiosines. Així com també podrem controlar amb precisió l'anàlisi d'aigües avall i fora de xip de la signatura molecular, la fisiologia cel·lular i la patologia dels teixits. Aquesta sèrie de funcionalitats les podrem aconseguir amb una incorporació més avançada de biosensors òptics, elèctrics, químics i biològics *in situ*. Tal com components microfluídics integratius per detectar els senyals clau de manera espaciotemporal, fet que suposa una alternativa en l'experimentació amb animals. El desenvolupament i la futura integració de nous enfocaments de detecció en plataformes microfluídiques d'OOAC, permetran codificar i seqüenciar informació molecular massiva a partir de teixits a una resolució a escala de genoma.

Inclús candidats a fàrmacs que semblen prometedors en les dues primeres fases de desenvolupament, només revelen efectes secundaris greus en assaigs clínics amb pacients, és a dir, en l'última fase abans de ser aprovat. Un avantatge únic de l'OOAC és la capacitat d'integrar el metabolisme de medicaments i els processos tòxics d'aquests en un sol dispositiu, fet que facilita l'avaluació de la toxicitat



Les futures plataformes OOAC es desenvoluparan basant-se en materials derivats del pacient, com ara teixits propis, ECM descel·lularitzats i altres materials biològics amb la finalitat d'aconseguir una medicina de precisió personalitzada, en la qual els biomarcadors de selecció i estratificació del pacient seran factors crítics que conduiran al desenvolupament de medicaments amb èxit.

En molts casos, les cèl·lules del teixit dels pacients són limitades en nombre, tenen un potencial proliferatiu baix o es requereix la recollida de mostres invasives. Aquesta indisponibilitat i poca fiabilitat de les fonts de cèl·lules dels pacients presenten una barrera significativa. Estudis recents han demostrat que les cèl·lules mare pluripotents induïdes pel pacient (iPSC) serveixen com a font cel·lular alternativa i il·limitada per produir òrgans o teixits diana propis, permetent així la construcció d'OOAC específics del pacient, per al modelatge personalitzat de la malaltia i el cribratge de fàrmacs.

També es preveuen diversos avantatges futurs, particularment en el modelatge i anàlisi de malalties humanes rares, restringides pels estudis biològics disponibles i el consegüent elevat cost de recerca i desenvolupament.

Per últim, els dispositius microfluídics tenen avantatges per superar més límits, com ara una automatització més senzilla, l'ús de menys volum de mostra, portabilitat, proves simultànies i paral·leles, anàlisi més ràpid i menor cost per assaig. Entre altres beneficis únics com la disminució del consum de reactius i el risc de contaminació i la seva fàcil reproductibilitat.

Per tant podem concloure que l'OOAC consisteix en una plataforma molt petita que conté volums molt reduïts i que pot reunir totes les funcions del laboratori en un format de xip. A la vegada que ofereixen plataformes *in vitro* úniques per a assajos de cultiu cel·lular d'alt rendiment. Poden ser una alternativa prometedora per evitar problemes ètics relacionats amb l'ús d'animals i complir els principis rectoris (substitució, reducció i perfeccionament).

### **3.7. Utilitats i aplicacions**

Els OOAC tenen diverses utilitats i aplicacions, la qual cosa fa que representin una gran aportació en el camp de la investigació de les ciències biomèdiques.

#### **3.7.1. Diagnòstic**

Es presenta un futur prometedor i emocionant pels dispositius *laboratory-on-a-chip* (LOC) altament integrats en el diagnòstic i la terapèutica. Algunes de les aplicacions interessants

d'aquests dispositius, per exemple són: la detecció ràpida d'infeccions víriques i la detecció precoç de biomarcadors de càncer directament de fluids corporals. Permeten introduir mostres de pacients (per exemple, sang, saliva, orina, etc.) en un sol xip i es produeixen totes les etapes del procés de laboratori, inclosa la separació, filtració, anàlisi i lectura dels resultats. La crisi mundial de la salut a causa del SARS-CoV-2 (COVID-19) posa de manifest la importància del diagnòstic precoç dels casos sospitosos i el control del tractament de les persones infectades per evitar una nova propagació de la infecció.

### 3.7.2. Testatge i detecció de la toxicitat dels medicaments

L'*Human-on-a-chip* també ens pot servir com a eina útil per a una avaluació eficient i precisa de la toxicitat del medicament abans que aquest s'aprovi per al seu ús en assajos clínics.

A més, els xips de múltiples òrgans els podem aplicar específicament per estudiar els efectes tant dins com fora de l'objectiu, així com el metabolisme de fàrmacs entre òrgans. Per exemple, una plataforma de múltiples òrgans pot permetre la integració d'un mòdul d'anàlisi de biomarcadors múltiples, automatitzat i no invasiu per controlar la toxicitat dels fàrmacs al fetge i al cor.

A causa de les heterogeneïtats genètiques i microambientals, les respostes dels pacients als fàrmacs sovint són variables, cosa que requereix una avaluació precisa de l'eficàcia terapèutica i l'optimització per a cada pacient. L'OOAC integra cèl·lules primàries derivades de donants sans i pacients, demostrant la viabilitat d'avaluar les respostes farmacèutiques específiques del pacient en un entorn fisiopatològic humà organotípic. Les plataformes OOAC personalitzades de cèl·lules derivades de pacients o biòpsies de teixits, ens permeten recapitular la complexitat de cada pacient en un *biochip*, mantenint aquesta complexitat clínicament rellevant. A més, tenen el potencial d'accelerar processos de descobriment de fàrmacs que requereixen molt de temps i costos econòmics. Per tant, la detecció ràpida del millor enfocament per al tractament proporciona una atenció sanitària personalitzada a les persones amb diferències genètiques com per exemple, el lliurament dirigit de fàrmacs i la teràpia combinada. El lliurament directe i localitzat de molècules de fàrmacs a teixits o òrgans específics del cos augmenta la concentració terapèutica desitjada en el teixit dirigit, tot minimitzant els efectes secundaris sistemàtics dels medicaments. En la teràpia combinada, els metges combinen dos o més agents terapèutics o enfocaments per descobrir el tractament òptim per a cada pacient. Actuant directament sobre cèl·lules diana i personalitzant el tractament del pacient, especialment per a malalties com el càncer, en les quals és crucial una

teràpia eficaç i no hi ha lloc per a la prova i error. Aquestes plataformes tenen un futur cada vegada més prometedor en la medicina de precisió personalitzada.

### *3.7.2.1. Mètode per guiar els fàrmacs*

Per cartografiar els processos de transport i lliurament de fàrmacs a través de diferents OOAC, hauríem d'establir un sistema circulatori fluídic entre múltiples compartiments d'òrgans. Així com modelar la vasculatura i els teixits. Per exemple, s'ha aconseguit desenvolupar un xip multi-òrgan vascularitzat amb compartiments d'intestí, fetge, ronyó, cor, pulmó, pell, BBB i òrgans cerebrals connectats fluidament mitjançant microcanals vasculars endotelials i perfusats periòdicament amb un substitut de sang comú. A més de la vascularització i el sistema circulatori, les barreres fisiològiques en altres teixits o òrgans, com : BBB, barrera sang-aire al pulmó, barrera de filtració glomerular al ronyó o barrera placentària, també són essencials per estudiar la cinètica del transport i el lliurament del medicament per així poder predir quantitativament la distribució d'aquest.

### **3.7.3. Investigacions de l'angiogènesi**

L' OOAC s'utilitza també en investigacions fonamentals sobre l'angiogènesi<sup>2</sup>, el creixement i la propagació del tumor, així com la funció de la barrera hematoencefàlica (BBB) i la seva permeabilitat. Aquesta tecnologia s'ha convertit en una poderosa eina per estudiar els processos i mecanismes polifacètics que contribueixen a la progressió i tractament del càncer. Els sistemes de xips multi-òrgans relacionats amb la vasculatura i el sistema circulatori tenen una rellevància crucial per dilucidar el desenvolupament local de malalties, com la iniciació del càncer i la metàstasi.

### **3.7.4. Sistemes de suport d'òrgans bioartificials**

A part, recentment, el desenvolupament de dispositius bioartificials com la placenta artificial i els dispositius d'assistència renal han demostrat que mitjançant la integració de nombroses plataformes d'OOAC, és possible crear nous sistemes de suport d'òrgans bioartificials que poden facilitar la curació d'òrgans danyats o marginals sense la necessitat de dur a terme un trasplantament. Aquest sistema pot ajudar a augmentar el nombre d'òrgans disponibles per al trasplantament i millorar els resultats d'aquest.

<sup>2</sup> Angiogènesi és la formació de vasos sanguinis nous. Aquest procés consisteix en la migració, creixement i diferenciació de cèl·lules endotelials, les quals recobreixen les parets internes dels vasos sanguinis.

### 3.7.5. L'impacte de les nanopartícules

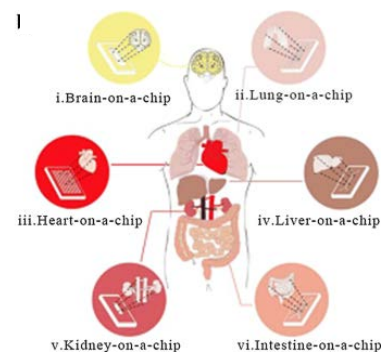
L'OOAC compta amb un disseny sofisticat que permet la simulació *in vitro* dels microambients *in vivo*, proporcionant així plataformes robustes per avaluar la nanomedicina. Aquesta disciplina consisteix en l'ús de materials a nanoescala dissenyats en una àmplia gamma d'aplicacions diagnòstiques i terapèutiques, que es poden aplicar al tractament de moltes malalties. Tot i el ràpid progrés i l'enorme potencial que presenta la nanomedicina en les darreres dècades, el procés de translació clínica encara és bastant lent, a causa de la dificultat per comprendre, avaluar i predir els comportaments dels nanomaterials dins del complex entorn dels éssers humans. Les tècniques basades en microfluídics OOAC ofereixen una forma prometedora de resoldre aquests reptes.

### 3.7.6. Teràpies per a malalties minoritàries

Trobar noves teràpies per a malalties rares, és a dir, minoritàries, és una altra aplicació prevista per als dispositius OOAC en el futur. Els escassos beneficis econòmics de les farmacèutiques i les elevades despeses per desenvolupar nous tractaments per a malalties rares són els principals motius pels quals la majoria de les empreses d'aquest sector, no estan interessades en invertir en el desenvolupament de tractaments per a aquest tipus de malalties. Els dispositius OOAC personalitzats que utilitzen mostres de pacients permeten realitzar assaigs amb un *biochip* per abordar els reptes del descobriment terapèutic de malalties rares. Una mostra és l'ELA que afecta a cada persona de diferent manera i per tant seria una bona eina per estudiar-la, comprendre-la i cercar una cura.

## 3.8. Tipus d'òrgans que s'han modelat mitjançant OOAC

Són d'interès particular el modelatge del fetge i del ronyó, que tenen un paper fonamental en el metabolisme dels medicaments, així com el cor, que es veu fortament afectat per la toxicitat d'aquests. Tenint en compte les diverses vies de lliurament de medicaments, com la transdèrmica, l'administració oral i la injecció intravenosa, es poden integrar els compartiments de la pell, l'intestí i la medul·la òssia. També s'han dissenyat i fabricat altres OOAC com els vasos sanguinis, la BBB, el múscul esquelètic i el sistema nerviós central (SNC).



**Figura 9.** Principals tipus d'òrgans que s'han modelat mitjançant OOAC.

Actualment, s'està desenvolupant una versió avançada, denominada *Body-on-a-Chip* o *Human-on-a-Chip*, per reflectir la fisiologia de tot el cos humà mitjançant una plataforma única. Els multiòrgans en un xip es produeixen en cambres separades però interconnectades que demostren la rellevant resposta interorgànica a l'administració de fàrmacs. Aquest sistema proporciona una visió més clara de la toxicitat i les contraindicacions o efectes adversos dels medicaments.

Tot i que els xips d'un òrgan se centren en imitar les funcions dels òrgans individuals, els xips multiòrgans que integren múltiples unitats d'òrgans, com el compartiment intestinal per absorbir els fàrmacs, el compartiment hepàtic per al metabolisme dels fàrmacs i el compartiment renal per eliminar els fàrmacs, en un sol xip permeten estudis més complets. Ja que aquest sistema pot simular els efectes sinèrgics de múltiples òrgans i construir una xarxa d'òrgans per estudiar l'absorció, distribució, metabolisme i eliminació de fàrmacs al cos. Per a que això es compleixi cal tenir en compte la diferenciació de les condicions de cultiu cel·lular en un xip de diversos òrgans.

A continuació es recull en la taula següent un resum sobre els principals tipus de plataformes i dispositius OOAC per entendre les malalties humanes.

**Taula<sup>3</sup>:** Resum de models d'òrgan-on-xip per entendre les malalties humanes.

Òrgan	Últims avenços	Orientacions futures	Referències
Cor	Capacitat d'imitar la mecànica de <i>Frank-Starling</i> en cardiomiòcits i de mostrar les contraccions auxotòniques adequades.	Manca de models ben desenvolupats que utilitzen cardiomiòcits de fenotip adults per a estudis de fàrmacs. Generalització limitada.	Sidorov et al. (2017) i Skardal et al. (2017)
Ronyó	La recapitulació de podòcits madurs i funcionals al glomèrul permet un filtratge més selectiu en models renals. Imita la nefropatia de la diabetis mellitus tipus II al glomèrul.	Produeix un dispositiu nefrona-mimètic més complet que incorpori glomèrul amb podòcits i túbul contornejat proximal.	Musah et al. (2017) i L. Wang, Tao, Su, Yu, Yu i Qin (2017)

<sup>3</sup> Taula extreta de: MITTAL, Rahul Mittal; WOO, Frank W., CASTRO, Carlo S.; COHEN, Madeline A.; KARANXHA, Joana; MITTAL, Jeenu. *Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications* [en línia]. Cellular physiology: Wiley Online Library, juny 2019, vol.234, núm.6, p. 8352-8380. <<https://doi.org/10.1002/jcp.27729>> [Consulta: 02/07/2021]

Òrgan	Últims avenços	Orientacions futures	Referències
Pulmó	S'ha demostrat que la ventilació biomecànica augmenta la resistència de certs càncers de pulmó a la teràpia tradicional i en aquests models les empreses farmacèutiques utilitzen per descobrir fàrmacs.	No s'ha produït un model global d'estudis inflamatoris adequats, implicació del sistema immunitari i ventilació biomecànica per als estudis de càncer.	Hassell et al. ( <a href="#">2017</a> ), Jain et al. ( <a href="#">2018</a> ), i Benam et al. ( <a href="#">2017</a> )
Intestí-intestí-estómac	Moltes interaccions hoste-microbi amb organoides intestinals ( <i>Salmonella</i> , <i>H. pylori</i> , <i>C. difficile</i> ).	Entendre les interaccions epitelials i mesenquimals, el lumen és un problema organoide.	Eicher et al. ( <a href="#">2018</a> )
fetge	Bioimpressió de teixit hepàtic que manté la funció durant més temps que abans, de manera que tinguin una millor oportunitat per estudiar el metabolisme dels fàrmacs.	La bioimpressió hauria de combinar-se amb la microfluídica per a multiòrgans per entendre millor el metabolisme de primer pas.	Kizawa, Nagao, Shimamura, Zhang i Torii ( <a href="#">2017</a> )
Placenta	Transport de drogues modelat amb èxit mitjançant <i>placenta-on-a-chip</i> .	Els models actualment utilitzen cèl·lules derivades del càncer, necessiten utilitzar cèl·lules primàries.	Kuo et al. ( <a href="#">2018</a> ) i Blundell et al. ( <a href="#">2018</a> )
Adipós	Creació d'adiposferes que imiten cèl·lules adiposes <i>in vivo</i> , ús de construccions per estudiar la captació de glucosa, desenvolupament de mètodes per atrapar cèl·lules.	La flotabilitat cel·lular suposa un repte únic per atrapar cèl·lules amb dispositius microfluídics, manca de coneixement general sobre com funciona el teixit adipós, especialment el greix marró.	Daquinag, Souza i Kolonin ( <a href="#">2013</a> ), Zambon et al. ( <a href="#">2015</a> ), Loskill et al. ( <a href="#">2017</a> ) i Brooks, Judd i Easley ( <a href="#">2017</a> )
Retina	Pot modelar <i>in vivo</i> amb eficàcia utilitzant organoides, millora en les tècniques de síntesi d'organoides i habilitats d'imatge.	Dificultat per preservar la integritat de les cèl·lules durant la impressió tridimensional (3D), menys progrés per a l' <i>eye-on-a-chip</i> .	Chen, Kaya, Dong i Swaroop ( <a href="#">2016</a> ), DiStefano et al. ( <a href="#">2018</a> ), Browne et al. ( <a href="#">2017</a> ), Vergara et al. ( <a href="#">2017</a> ) i Lorber, Hsiao, Hutchings.

Òrgan	Últims avenços	Orientacions futures	Referències
Os	Millora dels protocols d'impressió 3D incloent vascularització, nous bastides i tècniques de sembra; progrés en <i>bone-on-a-chip</i> i aplicacions, inclòs l'estudi de metàstasis a l'os d'altres òrgans.	<i>Bone-on-a-chip</i> no ha vist tant progrés com altres modalitats, més difícil de crear empelts per a grans defectes.	Sithole et al. ( <a href="#">2018</a> ), Hernandez, Kumar i Joddar ( <a href="#">2017</a> ), Nyberg, Rindone, Dorafshar i Grayson ( <a href="#">2017</a> ), Alluri et al. ( <a href="#">2018</a> ) i Daly, Pitacco, Nulty, Cunniffe i Kelly ( <a href="#">2018</a> )
Cervell	Pot modelar el desenvolupament primerenc del cervell embrionari, estudiar els teratogens, entendre quins fàrmacs inhibeixen que el virus Zika entri al cervell embrionari en desenvolupament.	Estandardització i reproductibilitat dels organoides cerebrals.	J. Zhou et al. ( <a href="#">2017</a> ), Watanabe et al. ( <a href="#">2017</a> ), i Qian et al. ( <a href="#">2016</a> )
Multiòrgan	Capaç de demostrar la toxicitat diferencial de la bleomicina (afecció només del cor que mostra no toxicitat) en una construcció multiorgànica de cor, pulmons i fetge. Després del metabolisme, la bleomicina va mostrar toxicitat per als cardiomiòcits alterant la freqüència cardíaca i, finalment, aturant els batecs del cor.	Cada sistema d'òrgans va ser tractat i madurat químicament com un òrgan genèric i sencer; tanmateix, l'objectiu d'aquest sistema integrat multiorgànic és personalitzar-lo a les necessitats mèdiques individuals.	Skardal et al., ( <a href="#">2017</a> )



### 3.9. Problemes d'aplicacions pràctiques

Malgrat els nombrosos avantatges, les diverses tècniques encara són relativament noves i cal millorar-les encara més per obtenir una resposta més satisfactòria a les proves dels fàrmacs. Ja que és fonamental tenir una dosi precisa que sigui eficaç però no tòxica.

Malgrat el progrés i els desenvolupaments tecnològics actuals, encara hi ha diversos reptes biològics i d'enginyeria insatisfets que limiten el seu desenvolupament i la seva aplicació generalitzada en el camp biomèdic degut a la complexitat del sistema humà.

#### 3.9.1. Reptes biològics

La majoria de les plataformes OOAC microfluídiques encara es troben en fase de prova a causa d'alguns reptes importants, inclosos els baixos rendiments, la curta vida útil del *biochip* (ja que els canals sovint s'obstrueixen), la preparació de mostres complexes i limitacions relacionades amb el material per a la seva fabricació.

#### 3.9.2. Reptes tecnològics

També queden per resoldre problemes tant en l'enginyeria com en la tecnologia d'aquests dispositius. Tanmateix, un model pràctic *in vitro* hauria de ser un sistema que pogués observar i registrar diverses respostes fisiològiques a estímuls biològics específics. Per satisfer aquests requisits, hauríem de desenvolupar tecnologies d'observació que poguéssin avaluar les respostes biològiques múltiples. En termes de millora dels protocols d'impressió 3D, diversos grups han desenvolupat nous tipus de bastides i tècniques de cultiu, maneres de millorar la vascularització i comparacions entre els components del bastiment existents.

Un disseny adequat per a la plataforma OOAC microfluídica ha de ser prou senzill per facilitar la fabricació i el funcionament dels usuaris finals. Alhora, ha de tenir una complexitat adequada per imitar la sofisticada estructura i funció fisiològica d'un òrgan o d'un teixit

Tot i la revolució que la tècnica d'OOAC pot comportar per a la indústria farmacèutica, encara queda per determinar el seu impacte. I es presenten grans desafiaments en la transició de la investigació bàsica a la integració preclínica d'aquesta plataforma.

## 4. ESCLEROSI LATERAL AMIOTRÒFICA

Donats els nombrosos avantatges que comporten els xips microfluídics, és temptador pensar que podria ser una bona eina per estudiar la malaltia de l'esclerosi lateral amiotròfica. Una malaltia mortal que pel fet de ser minoritària i dels seus complexos mecanismes patològics, avui dia encara no hem aconseguit entendre-la i per tant investigar-la suficient per trobar una cura.

### 4.1. Què és l'Esclerosi Lateral Amiotròfica

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) és una malaltia neurodegenerativa i minoritària que afecta el teixit neuromuscular. És una de les malalties neurodegeneratives més devastadores i que afecta a 5 de cada 100.000 persones en tot el món. No hi ha cura disponible, és progressiva i mortal.

Aquest trastorn crònic de les neurones motores del cervell, del tronc cerebral i de la medul·la espinal que té com a conseqüència provocar una paràlisi motora progressiva. Aquest procés és el resultat de la proliferació d'astròcits causada per la degeneració de les vies corticoespinals, la qual cosa afecta especialment les neurones motores superiors i inferiors. Això condueix a debilitat motora, disfunció bulbar i finalment et du a la mort prematura, principalment, a causa de la insuficiència respiratòria. Tot això en una mitjana de 3 a 5 anys després de l'aparició dels símptomes. Però encara avui dia, l'origen de la malaltia és desconegut.

Entre el 5% i el 10% dels casos es defineixen com a ELA familiar a causa de la demostració de l'herència directa, mentre que la resta de casos no tenen una causa hereditària o ambiental clara i se'ls coneix com ELA esporàdica.

En els darrers anys, els estudis genètics han relacionat mutacions en més de 30 gens que causen ELA.

Els medicaments que s'han utilitzat fins ara per tractar i pal·liar els símptomes de l'ELA, com el *Riluzol* i l'*Edaravona*, han demostrat la seva ineficàcia.

Per tant, és urgent el desenvolupament de noves teràpies efectives per tractar aquesta malaltia i també models rellevants *in vitro* que permetin testar nous agents terapèutics.

Per a dur a terme això és necessari obtenir més informació sobre els mecanismes subjacents a la degeneració de les neurones motores en l'ELA, ja que no hi ha prou coneixement sobre l'origen, les causes, els mecanismes fisiopatològics i el progrés de la malaltia, degut a que es tracta d'una malaltia minoritària, i que curiosament afecta a tots el pacients de manera

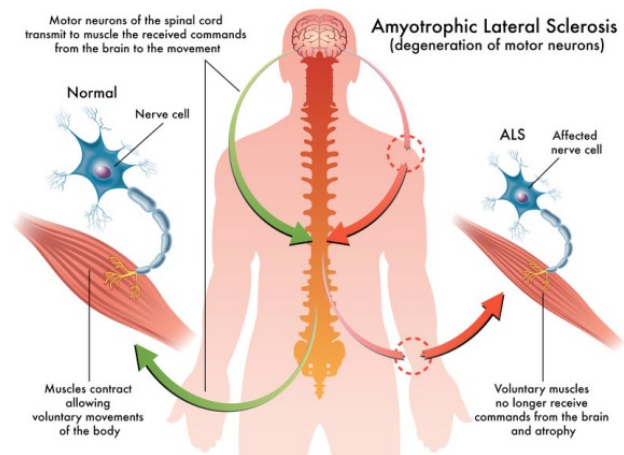
diferent. La qual cosa indica i suggereix que podríem haver topat amb una malaltia que necessita de la medicina personalitzada per a ser tractada.

En molts casos, un dels problemes afegits és la dificultat per arribar al diagnòstic, això significa que des del moment en què la malaltia es manifesta a què és diagnosticada i tractada degudament, aquesta avança i la persona empitjora en qüestió de molt poc temps. Inclús es creu que prèviament a la manifestació dels símptomes físics i detectables a nivell més superficial, la malaltia ja s'ha iniciat fins i tot uns anys abans.

També cal afegir que tot i que es considera una malaltia minoritària perquè no hi ha prevalença de casos, cada dia a Espanya es detecten 3 casos nous i es moren 3 pacients. Això ens portar a pensar que potser caldria canviar-li l'etiqueta de “minoritària”.

## 4.2. Mecanismes patològics

L'evidència acumulada suggereix que els trastorns neuromusculars com l'ELA són axonopaties distals, on la disfunció a la unió neuromuscular (NMJ) ja és evident abans de qualsevol símptoma clínic. Per adquirir més coneixement sobre la funció de NMJ i la seva contribució a la patologia de l'ELA, un nombre creixent d'estudis utilitza enfocaments *NMJ-on-a-chip*.



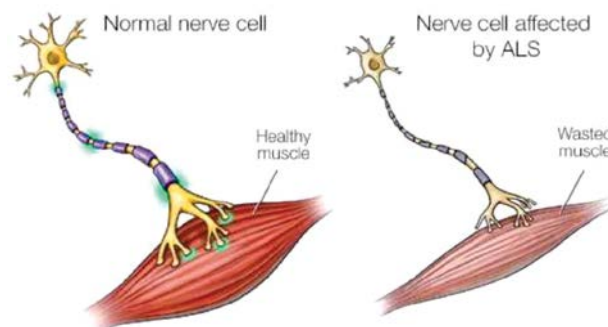
**Figura 10.** Com afecta l'ELA.

Les cèl·lules glials, com els astròcits i la microglia, segreguen substàncies que contribueixen a la neurotoxicitat. A més, la disfunció glial, per exemple, afecta la captació de glutamat per part dels astròcits, que es tradueix en un augment de  $Ca^{2+}$ . La seva afluència a les neurones motores, també contribueix a la degeneració d'aquestes. Proteïnes mal plegades mutants (com SOD1, C9ORF72, TDP-43 i FUS) formen agregats intracel·lulars, la qual cosa provoca una disfunció mitocondrial i un transport axonal alterat d'òrgànuls i ARN i, en última instància, condueix a la degeneració axonal.

Recents estudis han demostrat que la degeneració de l'axó es produeix abans de la pèrdua del cos de les cèl·lules neuronals en l'ELA. El transport axonal assegura el subministrament dinàmic de proteïnes, lípids i òrgànuls (com els mitocondris) a la NMJ des del soma. A més,

dóna suport a l'eliminació de proteïnes reciclades i mal plegades de l'axó, evitant així la formació d'agregats tòxics. Per tant si aquest és defectuós contribueix a l'aparició i a la patogènesi de l'ELA.

Els defectes de la vasculatura i de les cèl·lules musculars també contribueixen a la desnervació de la NMJ que condueixen a l'activació de respostes immunes (per exemple, l'activació de macròfags) i a lesions musculars cròniques, que es tradueixen en debilitat muscular, atròfia i deteriorament de la funció muscular.



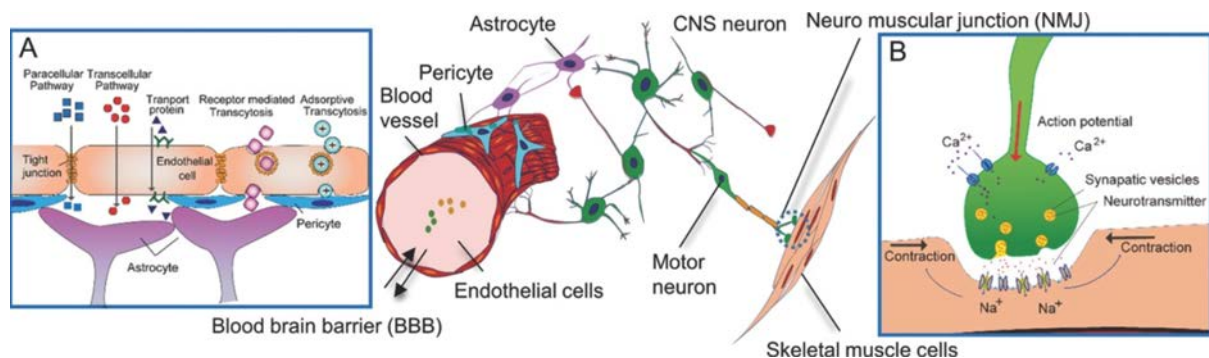
*Figura 11. Comparació d'una cèl·lula nerviosa sana i una afectada per l'ELA.*

### 4.3. Components del teixit neuromuscular afectats per l'ELA

El cervell és l'òrgan més complex del cos humà. El teixit neuromuscular en funcionament està constituït per diversos tipus d'elements. Tals com nombrosos tipus de cèl·lules, incloses les neurones, cèl·lules gials, cèl·lules mare neuronals (NSC) i cèl·lules del llinatge endotelial vascular cerebral. Totes elles estan connectades a través d'unes xarxes complexes anomenades sistema nerviós central (SNC) i sistema nerviós perifèric (SNP).

Els principals actors de les malalties neurodegeneratives incloent l'ELA, es troben al SNC i al SNP.

Totes les cèl·lules i elements que es veuen afectats per l'ELA els hem de tenir en compte a l'hora de modelar la malaltia en un xip microfluídic.



*Figura 12. Esquema de les cèl·lules del teixit neuromuscular que es veuen afectats per l'ELA.*

### 4.3.1. Interaccions entre cèl·lules en el SNP

El SNP es divideix en el sistema nerviós autònom, sensorial i somàtic.

El sistema nerviós somàtic regula el múscul esquelètic per controlar el moviment del cos, estimulants la contracció muscular i està format per neurones motores inferiors i neurones motores superiors. En particular, la disfunció de les neurones motores és crucial en la incidència de malalties neurològiques com l'ELA. Les neurones motores regulen el transport de senyals elèctrics al múscul, provocant que es contraguin o relaxin. La seva estructura bàsica inclou un receptor en un extrem i un transmissor en l'altre extrem connectat per un axó allargat. Una neurona motora forma una unitat motora amb fibres musculars esquelètiques inervades per terminals axonals. Un potencial d'acció generat per una neurona motora normalment porta totes les fibres musculars al llindar a través d' unions neuromusculars (NMJ). Una NMJ consisteix en la unió d'una neurona i una cèl·lula muscular esquelètica. Conté dues membranes: les membranes pre i postsinàptica. També conté petites vesícules esfèriques, que contenen neurotransmissors. El calci ( $\text{Ca}^{+2}$ ) entra a la neurona motora excitada, que al seu torn provoca exocitosis del neurotransmissor. L'acetilcolina (ACh) és el neurotransmissor secretat per les neurones motores somàtiques.

### 4.3.2. Les neurones motores

Existeixen diferents tipus de neurones motores i les podem classificar segons el tipus de fibra muscular que innerven:

- Les neurones motores alfa ( $\alpha$ ) innerven<sup>4</sup> fibres musculars extrafusals dins del múscul esquelètic, formant l'estructura principal generadora de força. Les d'aquest tipus són les més abundants i es poden classificar en tres subtipus segons la base de les propietats contràctils de la unitat motora que formen amb les fibres musculars: fatigable per contracció ràpida, resistent a la fatiga per contracció ràpida i resistent a la fatiga per contracció lenta. No tots els subtipus de neurones motores es veuen afectats per igual en l'ELA. Les unitats motores fatigables de contracció ràpida degeneren primer amb una pèrdua gairebé total dels terminals de la NMJ, seguides de la degeneració de les unitats motores resistents a la fatiga per contracció ràpida, mentre que pel contrari, les unitats motores resistents a la fatiga per contracció lenta es mantenen ben conservades fins a les etapes posteriors de la malaltia.

<sup>4</sup> Exercir, el nervi o els nervis, la seva acció (sobre els diferents òrgans o les diferents regions).

Aquest coneixement ajuda a explicar la neurodegeneració selectiva en l'ELA i pot ajudar al desenvolupament de la teràpia per a l'ELA i altres trastorns neuromusculars.

- Les neurones motores gamma ( $\gamma$ ) innerven les fibres musculars intrafusals dins dels fusos musculars i tenen un paper important en el control motor.
- Les neurones motores beta ( $\beta$ ) menys definides innerven tant les fibres intrafusals com les extrafusals.

#### **4.3.3. Síntesi local de proteïnes en axons motors espinals**

Les neurones motores espinals es localitzen a la medul·la espinal i expandeixen els axons a llargues distàncies per formar NMJ amb fibres musculars. Els axons tenen un paper important en el manteniment i reparació del sistema nerviós. A més d'en els axons, la síntesi local de proteïnes es pot produir a les sinapsis, contribuint al desenvolupament, la funció i la plasticitat d'aquestes. Les sinapsis consisteixen en la connexió eficient entre una motoneurona i una fibra muscular. Evidències convincents indiquen que l'afectació i degeneració axonal i de la NMJ precedeix els símptomes clínics en malalties de les neurones motores i es produeix abans de la pèrdua de cossos cel·lulars. Basant-se en aquestes observacions, potser si aconseguíssim protegir els axons amb l'objectiu de contrarestar la pèrdua axonal proporcionaria un potencial terapèutic i evitaria la mort de les neurones motores i com a conseqüència, que es produïssin símptomes clínics.

#### **4.3.4. Les cèl·lules o fibres musculars**

Les cèl·lules musculars són un component essencial de la NMJ i cada cop és més evident que les cèl·lules musculars es veuen afectades per l' ELA. Per exemple, el deteriorament no només s'observa en les neurones motores, sinó també en les cèl·lules musculars esquelètiques dels pacients amb aquesta malaltia. És important tenir en compte aquesta contribució específica de les cèl·lules musculars a la patogènesi de l'ELA a l'hora de modelar la NMJ en un xip microfluídic.

#### **4.3.5. El paper de les cèl·lules i coanòcits terminals de Schwann a la NMJ**

A més d'un terminal axònic i una fibra muscular, la NMJ té un tercer component cel·lular crític: la cèl·lula terminal de Schwann (TSC). Les TSC estableixen les connexions múscul-nervi. Després de la formació de la NMJ, les TSC participen en l'eliminació de sinapsis en la NMJ i controlen la seva eficàcia. A més, les TSC tenen un paper important en la remodelació de la NMJ després d'una lesió. Els canvis relacionats amb l'edat en les TSC poden contribuir a deteriorar la capacitat regenerativa de la NMJ i a la patogènesi de malalties de les neurones

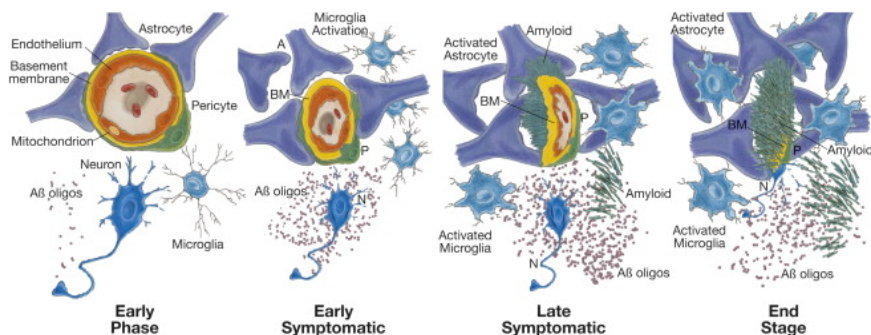
motores d'aparició tardana com l'ELA, ja que aquestes es veuen afectades per aquesta malaltia.

Els coanòcits, són cèl·lules gials que acompanyen les neurones durant el seu creixement i desenvolupament de la seva funció. Recobreixen a les prolongacions (axons) de les neurones formant una beina aïllant de mielina. Encara no s'ha determinat el paper exacte dels coanòcits. Tanmateix, se sap que els coanòcits responen en 24 hores a la denervació muscular i a lesions nervioses proliferant i estenent-se per tota la NMJ. Això suggereix el seu paper en la reparació i regeneració del nervi.

#### 4.3.6. Unitat neurovascular/Unitat funcional de la BBB:

La barrera hematoencefàlica (BBB) és un conducte dinàmic i altament selectiu que manté l'entorn químic i el medi neuronal únic del cervell. Aquesta barrera específica, que té una permeabilitat molt baixa, proporciona un obstacle considerable en el subministrament de medicaments al cervell, alhora que la seva interrupció està implicada en la fisiopatologia de diverses malalties.

La ruptura de BBB pot iniciar el procés de la malaltia de l'ELA, donant lloc a una disfunció sinàptica i neuronal progressiva.



**Figura 13.** Esquema de la participació de la unitat neurovascular en la patogènesi de l'ELA.

#### 3.4.7. Matriu extracel·lular (ECM)

La composició de la ECM és molt específica del teixit i és important incorporar una ECM adequada per desenvolupar un model *in vitro* específic de l'òrgan, per tal d'imitar de manera realista el microentorn cerebral 3D.

La ECM contribueix a l'estabilització i organització estructural de les xarxes cel·lulars, actua com a font de senyals bioquímics i mecànics per a la funció i l'activitat cel·lular i té un paper important en el desenvolupament cerebral i la funció neuronal.



Utilitzem polímers naturals com àcid hialurònic, lecticans, glicoproteïnes i proteoglicans com a bastides per imitar l'entorn neuronal degut a la seva biocompatibilitat i la semblança estructural amb la ECM respecte el teixit d'origen. A més, tenen l'avantatge de retenir els factors de creixement i les molècules d'adhesió que afavoreixen la fixació, el creixement o la diferenciació cel·lular.

Inclús, hi ha molts polímers sintètics que es podrien introduir com un bastiment adequat per donar suport al creixement i les funcions de les cèl·lules neuronals. Es podrien utilitzar per a diverses aplicacions aprofitant la flexibilitat per controlar una gran varietat de paràmetres físics com la mida dels porus, l'escala de fibra i la rigidesa, i paràmetres químics com el pH i la modificació de la superfície amb molècules cel·lulars. Aquests polímers sintètics inclouen: poli (etilenglicol), àcids poli L- làctics, poli D i àcids L- làctics- *co*- glicòlics i polímers hidrogels.

## 5. MODELATGE DE L'ELA MITJANÇANT XIPS MICROFLUÍDICS

Els models d'OOAC de teixits neuromusculars tenen una importància cabdal atesa la naturalesa delicada dels teixits que limita l'experimentació *in vivo*.

Si combinem els models existents actualment i també

incorporem interaccions neurovasculars, cèl·lules derivades del pacient (d'iPSC), optogenètica, microfluídica i tecnologia d'impressió 3D, això constituiria un pas endavant significatiu en el desenvolupament de models d'aquesta malaltia *in vitro*.

### 5.1. Aspectes a tenir en compte per a la fabricació d'un xip optimitzat

Un xip microfluídic òptim és aquell que és fiable, representatiu, ofereix la màxima eficiència i en podem extreure el màxim rendiment.

Hem de tenir en compte un seguit de components i factors per a la seva fabricació.

#### 5.1.1. Models 3D basats en hidrogel

Tradicionalment, els cultius en 3D inclouen cèl·lules cultivades en un hidrogel, ja sigui en plaques de pou o en membranes Transwell. Els cultius de cèl·lules 3D depenen en gran mesura de cèl·lules que creixen en hidrogels de matriu extracel·lular (ECM), inclosos el col·lagen, la fibrina i el matrigel.

En un hidrogel, les cèl·lules s'autoensamblen en microestructures de tipus fisiològic. Per exemple: és important no només co-cultivar diversos tipus de cèl·lules, sinó també compartimentar físicament les xarxes neuronals i les xarxes vasculars. També hem de considerar bioquímicament la composició de la ECM i els efectes adequats a sistemes específics de cultiu cel·lular. Així com aplicar tensions mecàniques dinàmiques, tensions fluides derivades de gradients de pressió i tensions físiques com les causades per la contracció

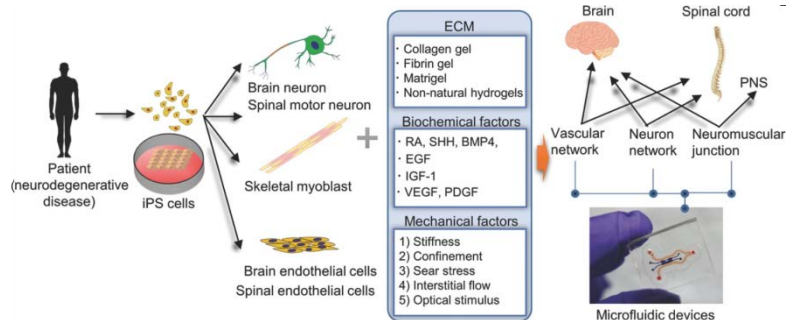


Figura 14. Models prospectius *in vitro* per a malalties neurodegeneratives.

muscular, per imitar un microambient altament organitzat com el cervell humà i la medul·la espinal.

Degut a que les co-cultures *in vitro* de neurona motora i miofibres primàries s'utilitzen des de fa temps per modelar circuits neuromusculars, és important comptar amb un cadafal d'hidrogel que estabilitzi les miofibres durant les contraccions. A aquestes afirmacions s'hi ha arribat a partir d'estudis que han demostrat que les miofibres cultivades es poden estabilitzar mitjançant una combinació d'hidrogel amb punts d'ancoratge artificials incorporats.

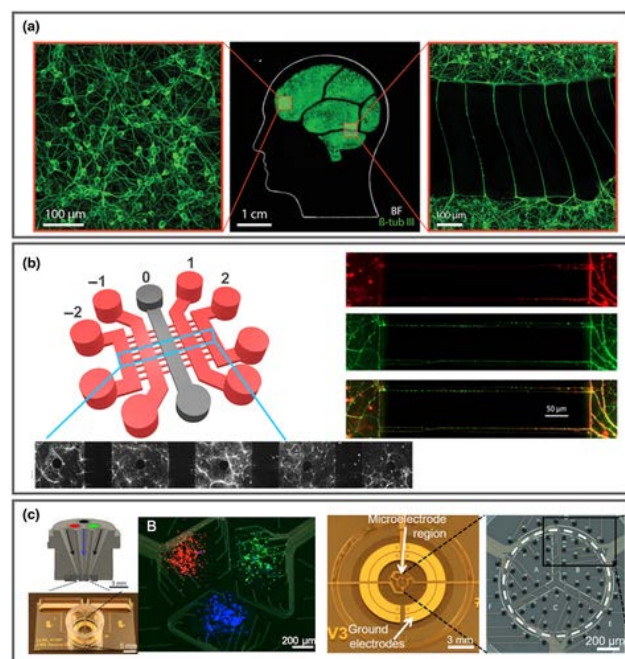
S'han desenvolupat diferents sistemes microfluídics en 3D que incorporen un cadafal d'hidrogel biocompatible, que pot proporcionar un microentorn 3D a les cèl·lules amb estímuls bioquímics i biofísics ben definits.

En alguns d'aquests models representatius s'ha mostrat que les dendrites s'alineaven paral·leles en l'estructura de la ECM, introduint el potencial de reconstituir una xarxa neuronal 3D direccional. Amb un disseny més avançat del canal, també s'ha imitat la formació d'un feix d'axons que té circuits neuronals 3D dins del patró del matrigel. A més, el sistema microfluídic que incorpora un hidrogel de ECM facilita el co-cultiu en 3D de diferents tipus de cèl·lules del sistema nerviós i ajuda significativament a mantenir la funció de la BBB.

### 5.1.2. La formació de circuits neuronals

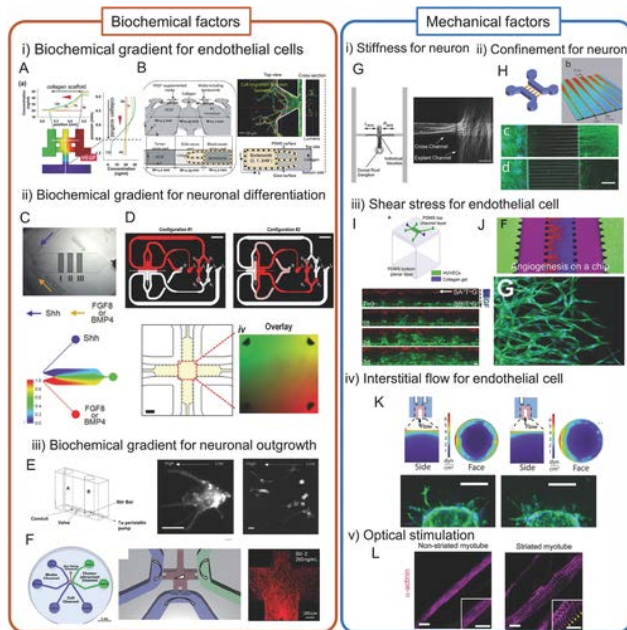
La formació de circuits neuronals requereix molta precisió en el seu desenvolupament. Hem d'incloure-hi l'especificació del destí cel·lular, la migració cel·lular, l'orientació de l'axó, el creixement dendrític, la selecció de dianes sinàptiques i la sinaptogènesi.

Els circuits neuronals es formen en hidrogels 3D amb l'objectiu d'alinejar les fibres de la ECM durant la gelificació per tal de guiar el seu creixement.



**Figura 15.** Xarxes neuronals *in vitro* que imiten la connectivitat entre regions cerebrals.

### 5.1.3. Factors bioquímics i mecànics a tenir presents



**Figura 16.**

*Factors bioquímics i mecànics en un dispositiu microfluidic.*

*Entre els factors bioquímics es troben: el gradient bioquímic per les cèl·lules endotelials, el gradient bioquímic per a la diferenciació neuronal i el gradient bioquímic per al creixement neuronal.*

*Entre els factors mecànics es troben: la rigidesa per neurona, el confinament per neurona, la tensió de cisalla per a cèl·lules endotelials, el flux intersticial per a cèl·lules endotelials i l'estimulació òptica.*

## 5.2. Modelar la NMJ d'ELA

S'ha descobert que la degeneració dels axons motors i de la NMJ es produeix a les primeres etapes de l'ELA i es veuen afectats molts elements cel·lulars claus de la NMJ.

La NMJ es compon de tres elements principals: la regió presinàptica que conté el terminal nerviós, la fissura sinàptica que és la zona intermèdia entre el terminal nerviós i la placa motora, i la placa final sinàptica o motora que és. l'altre costat del terminal axònic on es troba la membrana cel·lular de la fibra muscular.

Amb l'arribada d'un potencial d'acció a la NMJ, les neurones motores presinàptiques alliberen el neurotransmissor acetilcolina (ACh) dins de la clivella sinàptica. La unió de l'ACh amb el receptor situat a la membrana muscular post-sinàptica, condueix a la despolarització de la cèl·lula muscular i, per tant, desencadena l'alliberament intracel·lular de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) per iniciar la contracció muscular. Així, la NMJ facilita la transmissió de potencials d'acció d'un nervi a un múscul esquelètic.

La degeneració de les motoneurons i les seves connexions sinàptiques amb el múscul són la base de diverses malalties neuromusculars paralitzants i sovint mortals. En conseqüència, entendre la connectivitat múscul-nervi és clau per desenvolupar intervencions mèdiques que preservin o restaurin les funcions motores vitals en humans.

La qual cosa emfatitza la necessitat del desenvolupament de models *in vitro* de NMJ representatius.

### **5.2.1. Evidències de patologia precoç de la NMJ en ELA**

La unió neuromuscular (NMJ), és la sinapsi entre una neurona motora i la fibra muscular i té un paper clau en la patogènesi de l'ELA. Els defectes de la NMJ es detecten pre-sintomàticament en l'ELA i condueixen a la retracció de l'axó i a la degeneració de les neurones motores. Per tant, la NMJ no només és un model funcional important per dissecionar els mecanismes de la malaltia, sinó que també és un objectiu rellevant per a futures estratègies terapèutiques que s'orientin a la patogènesi de l'ELA en les primeres etapes de la malaltia.

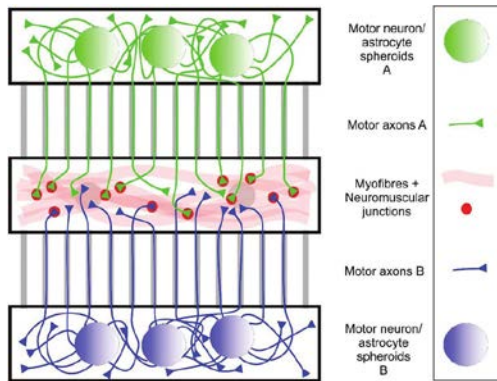
### **5.2.2. Xip microfluídic per estudiar la fisiologia en la NMJ**

El disseny d'una plataforma *in vitro* per estudiar la fisiologia de la NMJ requereix una comprensió de l'estructura i la composició d'aquesta unitat funcional. La NMJ és una regió especialitzada, una connexió sinàptica que controla processos vitals del cos com els moviments voluntaris i la respiració.

#### *5.2.2.1. Disseny i funcionament del xip*

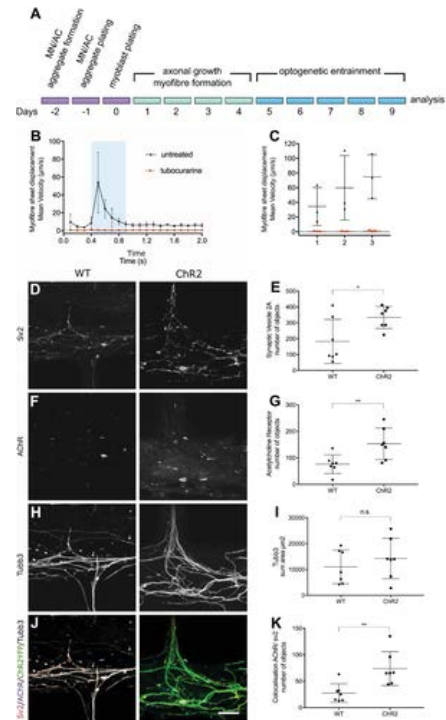
Els investigadors han establert dispositius microfluídics per modelar la NMJ. En aquests dispositius, les neurones motores i les cèl·lules musculars esquelètiques es cultiven en cambres separades i interconnectades. La segregació espacial permet estudiar els efectes dels medicaments en diferents parts de la NMJ.

En primer lloc, les miofibres han d'estar incrustades en una bastida d'hidrogel, que imiti la matriu extracel·lular muscular i afavoreixi la maduració muscular. En segon lloc, aquestes construccions de miofibra s'han de fixar a punts d'ancoratge, que serveixen com a equivalents als tendons i els mantenen suspesos. Tanmateix, orientar directament el múscul també pot ser beneficiós per a l'administració de medicaments. L'administració muscular de fàrmacs pot ser beneficiosa ja que les substàncies es poden aplicar molt a prop de la NMJ. A més, se sap que les molècules es transporten recíprocament del múscul al SNC després d'injeccions intramusculars per exercir els seus efectes terapèutics al SNC. Les plataformes microfluídiques són útils per optimitzar aquests enfocaments, ja que permeten un accés específic al compartiment muscular.



**Figura 17.** Model *in vitro* d'un circuit neuromuscular en un microaparell obert.

En l'esquema que es mostra, les motoneurons de dos genotips diferents es cultiven separadament als dos compartiments externs, permetent la comparació directa de la formació de la NMJ pels seus axons motors (verd i blau) al compartiment central de miofibra.



**Figura 18.** Circuits neuromusculars *in vitro* reunits en un dispositiu compartimentat.

Les interaccions de la motoneurona amb la vasculatura o les interaccions del múscul esquelètic amb la vasculatura són importants. Les xarxes vasculares donen suport al creixement neuronal i al desenvolupament de xarxes neuronals mitjançant una distribució eficient d'oxigen i nutrients. A més, les xarxes vasculares tenen un paper important en la degeneració de les neurones motores. L'entrada de toxines transmeses per la sang podria ser un factor clau primerenc en la patogènesi de l'ELA, que provocaria la mort de les neurones motores.

Com ja hem esmentat anteriorment, un problema comú en el desenvolupament de la teràpia per al sistema nerviós és el lliurament de medicaments al cervell i a la medul·la espinal. Els compostos terapèutics s'administren normalment a la sang, és a dir, que aquests compostos han de ser capaços de creuar les barreres endotelials per arribar al teixit implicat. La barrera hematoencefàlica (BBB) i la barrera sang-medul·la espinal dificulten aquest pas, ja que les barreres endotelials impedeixen l'entrada de diverses molècules al cervell perquè són molt impermeables. Per tant, això posa en relleu la seva importància per al modelatge *in vitro* de la NMJ.

L'optogenètica<sup>5</sup> és una tecnologia clau en el procés de disseny d'un xip microfluídic. Es podria utilitzar per provar la connectivitat funcional entre les neurones motores i les cèl·lules musculars esquelètiques activant òpticament canals iònics específics. L'estimulació òptica també es podria utilitzar per millorar la funció contràctil del múscul esquelètic. Diversos estudis ja han demostrat la possibilitat de combinar dispositius optogenètics i microfluídics per impulsar les contraccions musculars mitjançant l'estimulació òptica localitzada.

Per avançar encara més en les propietats fisiològiques dels models actuals de la NMJ, es poden afegir cèl·lules glials, ja que tenen un paper important en el manteniment de la NMJ i la malaltia que l'afecta.

Els dispositius microfluídics ofereixen diversos avantatges respecte als enfocaments tradicionals de cultiu a l'hora de modelar la NMJ, com ara la separació espacial de diferents tipus de cèl·lules i un major control sobre el microambient cel·lular. A més, són compatibles amb el cultiu de cèl·lules 3D, fet que millora la funcionalitat i la maduresa de la NMJ.

#### 5.2.2.2. Models de NMJ derivats del pacient i generats per iPSC

Per imitar les condicions específiques del pacient amb ELA *in vitro*, és necessari utilitzar cèl·lules neuronals i musculars de iPSC derivades del pacient.

Molts investigadors han començat a demostrar que aquestes cèl·lules iPSC derivades del pacient expressen el genotip i el fenotip de malalties específiques.

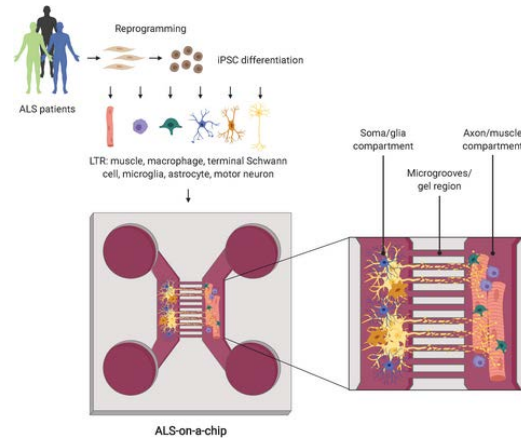
En particular, les cèl·lules mare inclús es poden modificar genèticament en models específics de malalties, és a dir, es poden programar provocant així, l'aparició *in vitro* de la malaltia.

Hi ha diversos models *in vitro* diferents per estudiar l'ELA. Els estudis d'allargament de neurites s'utilitzen per investigar l'ELA com a model de nova innervació de les neurones motores després d'una lesió en pacients.

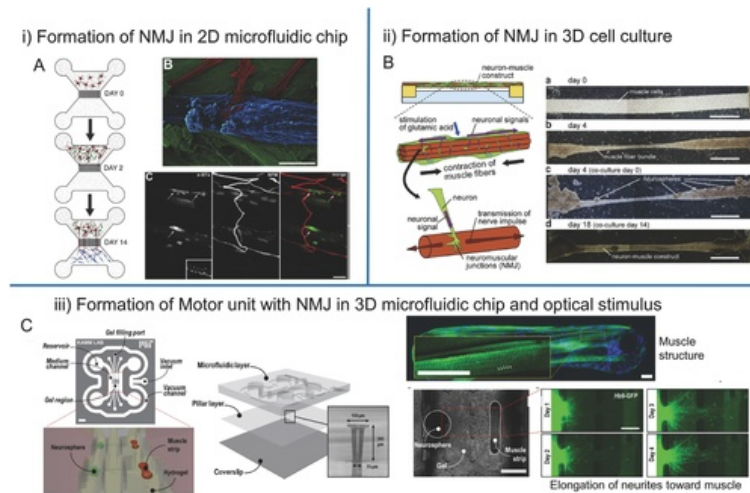
En l'enginyeria d'un nou sistema *in vitro* que imita la patogènesi de l'ELA, hauríem de reconstituir un sistema de co-cultiu integrat utilitzant diversos tipus de cèl·lules (per exemple, neurones motores, cèl·lules endotelials, cèl·lules Schwann i cèl·lules musculars esquelètiques) per entendre aquest complex mecanisme.

<sup>5</sup> L'optogenètica és una tècnica experimental que combina procediments d'enginyeria genètica i de física òptica per marcar neurones específiques del cervell i poder-les activar després a voluntat mitjançant raigs de llum de determinada freqüència.





**Figura 19.** ELA-on-a-chip o xip microfluídica d'ELA



**Figura 20.** Model in vitro d'unitat motora per a malalties neurodegeneratives.

A) Co-cultiu de cèl·lules musculars esquelètiques, neurones motores i astròcits de la medulla espinal de l'embrió del ratolí i del ratolí fetal. Les neurones motores i els astròcits es van cultivar al compartiment superior i els mioblasts esquelètics al compartiment inferior. Els axons de les neurones motores s'estenen cap al compartiment inferior pels canals prims i arriben al miotub esquelètic donant lloc a la formació d'una unió neuromuscular.

B) Formació in vitro d'unions neuromusculars amb miotubs esquelètics mitjançant el cultiu de cèl·lules musculars en una regió estreta patrocinada per Matrigel.

C) Una unitat motora dissenyada amb NMJ activada per optogenètica. L'estimulació òptica de les neurosfères va induir la contracció del feix muscular que indica la formació d'un NMJ funcional, així com la maduració del feix muscular.



## 6. PRÀCTICA EXPERIMENTAL AL LABORATORI

### ESTUDI COMPARATIU D' HIDROGELS PER A UN XIP MICROFLUÍDIC QUE MODELI LA MALALTIA DE L'ELA

#### 6.1. Objectius

- Estudiar i comparar les propietats dels hidrogels fotoreticulables *poly(ethyleneglycol) diacrylate* (PEGDA) i *gelatin methacrylate* (GelMA) mitjançant el fotoiniciador *Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate* (LAP). Per tal que les característiques que presentin siguin òptimes per construir un xip microfluídic en el qual modelar la malaltia de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica i poder fer un assaig clínic fiable.
- Investigar algunes de les diferents formes en què les propietats físiques d'aquests hidrogels es poden ajustar mitjançant l'exposició a la llum UV.

#### 6.2. Pregunta d'investigació

Quina matriu d'hidrogel resulta més apropiada per la fixació, implantació i integració de cèl·lules musculars esquelètiques (les quals es veuen afectades per l'ELA i són un element essencial per al seu modelatge *in vitro*) per tal d'elaborar un model fiable del teixit neuromuscular i en específic, capaç de modelar la malaltia de l'ELA mitjançant un xip microfluídic?

#### 6.3. Marc teòric

A l'hora de fabricar un xip microfluídic, cada material es correspon de manera inherent amb estratègies de microfabricació específiques i determinades propietats natives del dispositiu. Per tant, el material per fer el dispositiu té un paper dominant en les tecnologies microfluídiques.

La integració de la microfluídica amb la investigació biomèdica s'enfronta a limitacions considerables a causa dels seus materials corporals. Per combatre això, els hidrogels, un tipus de bastida biològica, s'han utilitzat en aplicacions relacionades amb el cultiu cel·lular com a material estructural altament permeable. Amb un alt contingut d'aigua, aquests són dotats d'una biocompatibilitat i degradabilitat òptima. Aquests materials poden prevenir danys mecànics i donar forma a disposicions tridimensionals.

És necessari tenir un material que actuï com a bastida donant suport a les cèl·lules que formaran els teixits. Aquesta bastida ha de tenir unes propietats físiques i químiques que imitin els teixits autòctons. Entre altres materials, els hidrogels es poden utilitzar com a bastides per desenvolupar teixits *in vitro*, gràcies a les propietats ajustables que presenten. Per aquest motiu, els hidrogels són àmpliament utilitzats en l'aplicació d'enginyeria de teixits.

El fet de desenvolupar diferents sistemes microfluídics en 3D que incorporen un cadafal d'hidrogel biocompatible, pot proporcionar un microentorn 3D a les cèl·lules amb estímuls bioquímics i biofísics ben definits.

Tradicionalment, els cultius en 3D inclouen cèl·lules cultivades en un hidrogel, ja sigui en plaques de pou o en membranes Transwell. Els cultius de cèl·lules 3D depenen en gran mesura de cèl·lules que creixen en hidrogels de ECM, inclosos el col·lagen, la fibrina i el matrigel. En un hidrogel, les cèl·lules s'autoensamblen en microestructures de tipus fisiològic.

Per al modelatge de la malaltia de l'ELA mitjançant un xip microfluídic és important comptar amb un cadafal d'hidrogel que estabilitzi les miofibres, les quals es troben dins de les fibres musculars o miòcits esquelètics, durant les contraccions.

Els hidrogels són xarxes reticulables (interconnectades) de polímers hidròfils que s'inflen a l'aigua. Un avantatge de l'ús d'hidrogels és que les seves propietats físiques i químiques es poden ajustar en funció de la seva composició i el mètode utilitzat per a la polimerització, fet que els fa molt versàtils. Una manera de classificar els hidrogels es basa en l'origen del polímer, ja sigui natural o sintètic.

Exemples de polímers d'origen natural són: proteïnes (com el col·lagen) i els polisacàrids (com l'alginat). Els hidrogels d'origen natural donen suport a les activitats cel·lulars i són biocompatibles i biodegradables. No obstant això, dos desavantatges importants són la baixa resistència mecànica i la variació per lots.

Els polímers sintètics estan fets de monòmers com l'etilè glicol i l'àcid làctic. La síntesi de polímers es pot controlar i adaptar amb precisió per donar-los una àmplia gamma de propietats. Alguns inconvenients són la baixa biodegradabilitat i l'absència de propietats bioactives inherents.

Els hidrogels sintètics de *poly(ethyleneglycol)* (PEG) s'utilitzen comunament per al cultiu cel·lular i aplicacions d'enginyeria de teixits perquè no són tòxics i presenten una bona hidratació i transport de nutrients. No obstant això, les cèl·lules no poden adherir-se, remodelar-se, proliferar a l'interior o degradar-se.

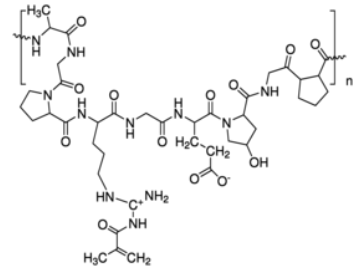
La *gelatin*, derivada del col·lagen, és un material natural al qual les cèl·lules poden adherir-se, propagar-se i degradar-se.

Tant el GelMA com el PEGDA poden ser modificats químicament per conferir-los la propietat de la fotoreticulació amb l'ajuda d'un fotoiniciador i l'exposició a la llum.

A continuació expliquem les característiques i propietats que presenten els materials amb els quals nosaltres hem treballat en aquest experiment: *poly(ethyleneglycol): diacrylate* (PEGDA) i *gelatin methacrylate* (GelMA). El fet d'informar-nos prèviament sobre experiments que han emprat aquests dos materials i fer recerca sobre investigacions que s'han realitzat anteriorment a través de l'IBEC, ens han dut a concloure que són els materials constituents d'hidrogel més favorables i adequats per a formar una estructura com la que volem obtenir per al nostre propòsit de fixar-hi fibres o cèl·lules musculars esquelètiques.

-Propietats i característiques de GelMA:

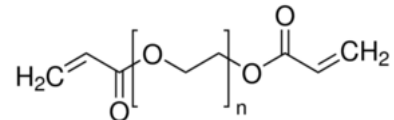
La *gelatin methacrylate* (GelMA) és un material d'hidrogel polimeritzable derivat de components naturals de la ECM. A causa del seu baix cost i la seva abundància, la gelatina s'ha convertit en un material molt buscat per a aplicacions d'enginyeria de teixits. L'addició de grups funcionals de metacrilamida fotoreticulables en GelMA permet la síntesi d'hidrogels biocompatibles, biodegradables i no immunogènics que són estables en condicions biològicament rellevants i promouen l'adhesió, propagació i proliferació cel·lular. A més de la polimerització ràpida, el grup funcional de metacrilamida també es pot utilitzar per controlar els paràmetres físics de l'hidrogel, com ara la mida dels porus i la taxa de degradació. A més, en els hidrogels GelMA, la bioactivitat inherent de la gelatina es combina amb l'adaptabilitat de la foto-reticulació.



**Figura 21.** Estructura molecular GelMA

-Propietats i característiques de PEGDA:

El *poly(ethyleneglycol) diacrylate* (PEGDA) és un derivat del polietilè glicol que es pot utilitzar per a una varietat d'aplicacions basades en l'administració de fàrmacs i l'enginyeria de teixits. S'utilitza com a solució prepolímer per a la formació d'un sistema polimèric entrecreuat.



**Figura 22.** Estructura molecular PEGDA.

Aquests dos components principals de l'hidrogel es combinen amb el fotoiniciador LAP per a que polimeritzin a partir de la seva exposició a llum UV.

## 6.4. Materials

- Làmpada reticulant UV
- Placa calefactora i olleta
- 48-Plaques de pou (com a motlles per a la fabricació)
- 24-Plaques de pou (per posar mostres, després de la fabricació)
- Pipetes Pasteur de plàstic
- Micropipeta i puntes (100-1000  $\mu\text{L}$ )
- Retoladors permanents i etiquetes (per l'etiquetatge)
- Gots de residus
- Eppendorfs
- Pinces
- Vas de precipitats
- Estamps d'estructura fibrosa lineal (motlle)
- Vasets de vidre
- Termòmetre
- Lupa binocular
- Plaques de Petri

## 6.5. Equipament

- Guants
- Bata
- Ulleres de protecció

## 6.6. Reactius

- Aigua destil·lada
- GelMA
- PEGDA
- LAP

## 6.7. Dissolucions/solucions

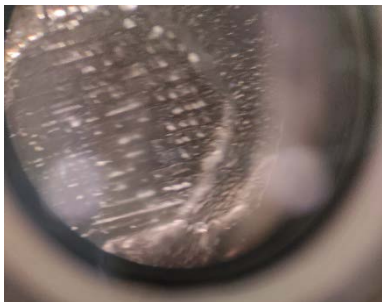
- GelMA (10% w/v)+LAP
- PEGDA (10% w/v)+LAP

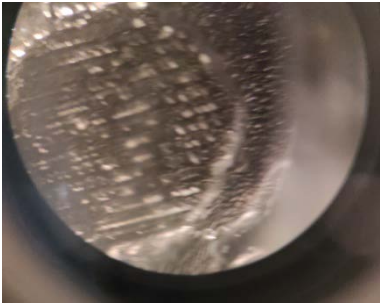
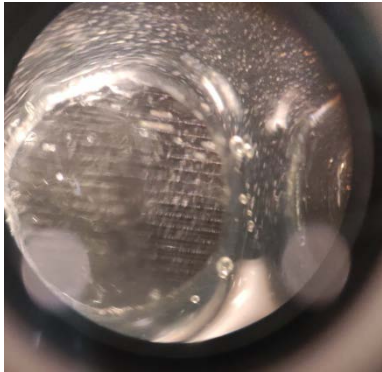
## 6.8. Mètode i procediment

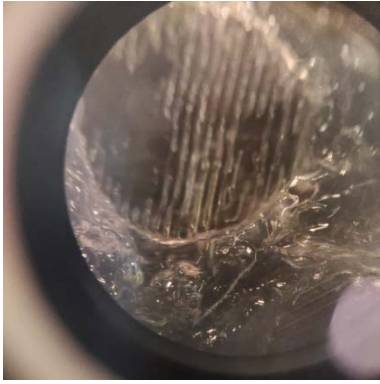
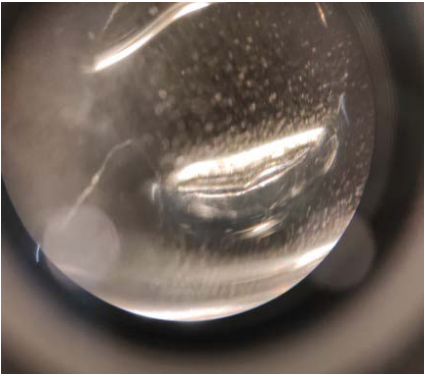
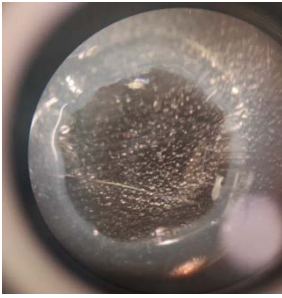
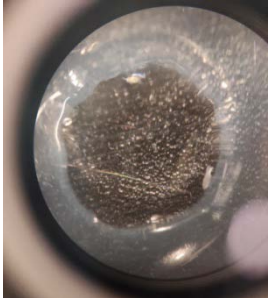
1. Mesurar la massa i la quantitat de GelMA (0,0500g), PEGDA (0,0500g) i LAP (0,0500g). Cal dipositar-los cada un en un eppendorf diferent i etiquetar-los. El LAP s'ha de ficar en un eppendorf opac per protegir-lo de la llum ja que és un fotoiniciador.
2. Guardar el LAP a temperatura ambient, el GelMA al congelador i el PEGDA a la nevera per tal de conservar-los en cas de dur a terme l'experiment dies posteriors a l'emmagatzematge d'aquests reactius als eppendorfs corresponents.
3. Amb l'ajuda de la micropipeta, cal preparar les dissolucions afegint 500µL a cada un dels eppendorfs que contenen GelMA, PEGDA o LAP (cada vegada que utilitzem una substància diferent, s'ha de canviar la punta de la micropipeta).
4. Ficar aigua a l'olleta i aquesta a una placa calefactora per fer un bany maria. Seguidament ficar els eppendorfs de GelMA i PEGDA dins dels gotets de vidre i aquests dins l'olleta que conté aigua. Amb la finalitat de dissoldre'ls en l'aigua ja que es troben en estat sòlid i poder així, obtenir les dissolucions. Amb l'ajuda del termòmetre mantenir l'aigua a una temperatura constant de 50 °C durant 1 hora. El LAP es dissol a temperatura ambient.
5. De tant en tant cal agitar els eppendorfs per homogeneïtzar les dissolucions.
6. Utilitzar la micropipeta per mesclar en un altre eppendorf diferent 500 µL de GelMA amb 500 µL de LAP i 500 µL de PEGDA amb 500µL de LAP per separat.
7. Aquests nous eppendorfs que contenen la mescla s'han d'agitar per homogeneïtzar.
8. És important ficar els eppendorfs dins els gotets de vidre en el bany maria per tal que no solidifiquin i es mantinguin en estat líquid o no gelifiquin.

9. Seguidament, emprant una pipeta Pasteur cal ficar una gota de cada solució a una pou de les plates i identificar la mescla.
10. A continuació cal aplicar l'estamp amb l'ajuda de les pinces. L'hidrogel adoptarà l'estructura induïda per l'estamp (motlle).
11. Successivament s'ha d'exposar la plata que conté les mostres en diferents pous a la làmpada reticulant de llum UV durant diferents períodes o intervals de temps.
12. Un cop treta la placa de pous de la làmpada UV, afegir un parell de gotes d'aigua destil·lada una mica temperada fent servir una pipeta Pasteur (per tal de facilitar l'extracció i no arrencar-ho) i retirar l'estamp amb les pinces.
13. Observar els resultats amb la lupa binocular i discutir si ha polimeritzat (solidificat) i si les característiques i propietats físiques i morfològiques que presenta són les adequades per al nostre propòsit.

### 6.9. Registre dels resultats obtinguts

SOLUCIONS I MATERIALS		
TEMPS d'exposició a UV (s)	GeIMA+LAP	PEGDA+LAP
30s	<p>Polimerització: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid.</p> <p>Estructura: Hem pogut retirar l'estamp amb facilitat. Les línies fibroses estan molt definides. La textura que presenta és adient per adherir-se les cèl·lules.</p>  <p><i>Figura 23.</i></p>	<p>Polimerització: No ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Semisòlid.</p> <p>Estructura: No es pot treure l'estamp correctament sense arrencar l'estructura.</p> <p>No tenim imatge del que s'observa a la lupa binocular ja que no és possible retirar l'estamp.</p>

60s	<p>Polimerització: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid en un grau superior a l'anterior.</p> <p>Estructura: Al retirar l'estamp s'arrenquen algunes zones i aquestes desapareixen. La resta de línies fibroses de les zones que queden estan molt marcades.</p>  <p><i>Figura 24.</i></p>	<p>Polimerització: No ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Semisòlid.</p> <p>Estructura: No es pot treure l'estamp correctament sense endur-te l'estructura.</p> <p>No tenim imatge del que s'observa a la lupa binocular ja que no és possible retirar l'estamp.</p>
90s	<p>Polimerització: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid en un grau superior a l'anterior.</p> <p>Estructura: Al retirar l'estamp s'arrenca quasi tot.</p> <p>Gairebé no queda res que hàgim pogut apreciar en l'observació. Per aquest motiu no tenim imatges capturades de la lupa binocular.</p>	<p>Polimerització: No ha polimeritzat del tot.</p> <p>Estat: Semisòlid.</p> <p>Estructura: Sí es pot treure l'estamp sense dificultat. Però a l'estar en estat semisòlid les línies fibroses estan poc definides i no són suficientment consistents ni tenen el grau suficient de rigidesa per poder fixar cèl·lules.</p>  <p><i>Figura 25.</i></p>

120s	<p>Polimerització: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid.</p> <p>Estructura: Al retirar l'estamp s'ha arrencat la zona central i només han quedat els costats, els quals pesenten regions i fragments de línies fibroses molt fines. A simple vista, aparenta tenir poca consistència, probablement per la gran quantitat que ens hem emportat al retirar l'estamp.</p>  <p><i>Figura 26.</i></p>	<p>Polimerització: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid.</p> <p>Estructura: Al treure l'estamp s'arrenca l'estructura.</p> <p>A la lupa binocular no es pot observar res al centre on hi havia l'estamp perquè ens l'hem endut, en canvi als voltants s'aprecia les restes d'hidrogel polimeritzat i en estat sòlid.</p>  <p><i>Figura 27.</i></p>
300s	<p>Polimeritzat: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid.</p> <p>Estructura: Al treure l'estamp s'arrenca l'estructura sencera.</p> <p>A la lupa binocular no es pot observar res al centre on hi havia l'estamp perquè ens l'hem endut, en canvi als voltants s'aprecia les restes d'hidrogel polimeritzat i en un grau de solidificació superior a l'anterior.</p>  <p><i>Figura 28.</i></p>	<p>Polimeritzat: Sí ha polimeritzat.</p> <p>Estat: Sòlid.</p> <p>Estructura: Al treure l'estamp s'arrenca l'estructura.</p> <p>A la lupa binocular no es pot observar res al centre on hi havia l'estamp perquè ens l'hem endut, en canvi als voltants s'aprecia les restes d'hidrogel polimeritzat i en un grau de solidificació superior a l'anterior.</p>  <p><i>Figura 29.</i></p>

## 6.10. Anàlisi dels resultats i conclusions

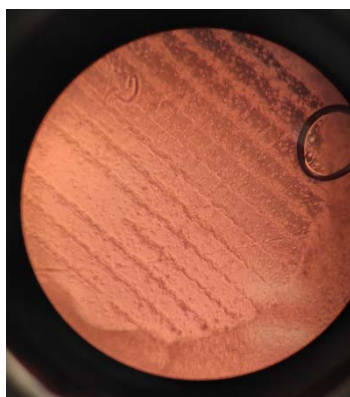
Un cop fetes les degudes observacions i analitzat els resultats obtinguts, podem concloure el següent:

En primer lloc, si les línies de l'estructura que ha adquirit l'hidrogel un cop retirat l'estamp no queden prou definides i amb el degut grau de consistència i rigidesa, una fibra muscular no es podrà adherir ni alinear per tal de formar una unió neuromuscular i consegüentment aconseguir un model d'ELA.

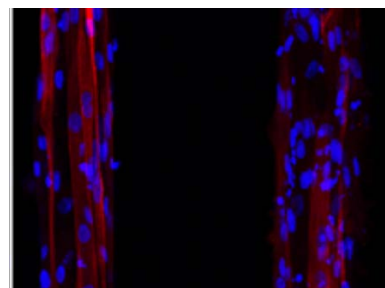
Com més temps d'exposició a llum UV, més sòlid perquè polimeritza més. Tot i així, cal destacar i tenir present que si solidifica més del compte, l'hidrogel es fixa en excés a l'estamp i quan el retirem s'arrenquen algunes parts o tot sencer. Això provoca que no constitueixi una estructura apta per a cultivar cèl·lules.

En aquest treball d'investigació i experiment, el GelMA ha resultat el material més adient per a fabricar un hidrogel apropiat per a integrar i fer créixer fibres musculars esquelètiques. Considerant que ha mostrat millor textura, major definició i un grau de polimerització superior en un període de temps més breu d'exposició a llum UV respecte el PEGDA. Ja que en el cas del PEGDA l'única prova en la qual hem pogut apreciar una estructura bastant definida i hem pogut observar una imatge nítida a la lupa binocular es trobava en estat semisòlid. Com a conseqüència fa que no tingui una textura suficientment adequada per integrar cèl·lules.

El fet que el GelMA presenti un grau òptim pel que fa a la polimerització en un període de temps més breu d'exposició a llum UV és molt favorable. Ja que hem tenir en compte que en aquest experiment no hem utilitzat cèl·lules. En cas de realitzar-lo amb les cèl·lules integrades, aquestes s'afegirien a la mescla de dissolucions GelMa + LAP abans de posar l'estamp i per tant, d'exposar la mostra a la llum UV. Considerant que la llum UV afecta a la viabilitat cel·lular, és fundamental seleccionar un material que requereixi temps d'exposició curts a la llum UV. Per tots aquests motius, en definitiva el GelMA és el material que hauríem d'utilitzar per a modelar l'ELA en un xip microfluídic.



**Figura 30.** Imatge d'un experiment similar realitzat a l'IBEC, però aquest amb cèl·lules ja integrades, les quals es poden observar en les vies.



**Figura 31.** Imatges confocals representatives de microteixits musculars esquelètics humans en 3D.

*Els miofibrils es s'observen de color vermell i els nuclis de color blau.*



Per últim, un possible mode d'acabar d'assegurar que l'hidrogel té les característiques i propietats físiques adequades per a les cèl·lules, en el cas del GelMA podríem exposar-lo a llum UV durant un període de 30 segons (com apareix anteriorment a la taula dels resultats, en que aquests han estat els més òptims) i un cop retirat l'estamp si l'exposéssim durant més temps a la llum UV (uns 30 segons més) ens assegurariem que les vies o canalets per on s'adheriran, s'alinearan i creixeran les fibres musculars presenten suficient solidesa, resistència i estabilitat.

## CONCLUSIONS

Malgrat el fet que només alguns estudis han informat de models *ELA-on-a-chip*, aquests posen de relleu el potencial d'aquestes plataformes per disseccionar mecanismes de la malaltia.

Donats els nombrosos avantatges que aporten els xips microfluídics tant a nivell econòmic com biotecnològic creiem que les plataformes *NMJ / ELA-on-a-chip* evolucionaran ràpidament en els propers anys. La qual cosa és de caràcter urgent ja que es tracta d'una malaltia degenerativa, mortal i sense cap tipus de tractament curatiu ni pal·liatiu generalitzat disponible.

Per tant com a resposta a la nostra primera pregunta d'investigació, podem concloure que els xips microfluídics sí poden modelar la malaltia de l'ELA i crear un model representatiu i fiable. També hem arribat a la conclusió que per poder modelar l'ELA és essencial modelar la NMJ, és a dir, la unió neuromuscular en un xip microfluídic. El cribratge de fàrmacs basat en microfluídica podria, per exemple, ajudar en el testatge de compostos, el disseny d'assaigs clínics, la predicció de la progressió de la malaltia i contribuir al desenvolupament d'aproximacions de medicina de precisió i personalitzada per a cada pacient.

Sense oblidar que per aconseguir-ho cal molt rigor en l'estudi de tots els elements implicats en la formació d'un xip microfluídic. Alhora que estem convençuts que aquests representaran, en un futur, un avenç important que contribuirà de manera molt notable al modelatge de malalties humanes.

Com a resposta a la nostra segona pregunta d'investigació, podem afirmar que l'hidrogel és un component que juga un paper clau en el modelatge de la malaltia. En aquest cas, nosaltres, hem arribat a la conclusió que l'hidrogel format per LAP+GelMA constitueix una estructura més apropiada o adient comparat amb l'hidrogel format per LAP+PEGDA per a integrar, fixar, alinear, dirigir, i fer créixer les cèl·lules o fibres musculars esquelètiques que es veuen afectades per l'ELA i que són un element fonamental a l'hora de modelar-la.

Finalment i en definitiva, concloem que els xips microfluídics podrien significar un avenç important cap al descobriment d'una cura per aquesta malaltia. Perquè si no tenim el control sobre la malaltia, la malaltia té el control sobre nosaltres.

## 8. BREU EXPLICACIÓ PER A QUÈ HO ENTENGUI LA PADRINA

Som conscients de la complexitat d'aquest treball. Per aquest motiu hem volgut incloure una breu explicació perquè tal com deia Einstein “ho pugui entendre la padrina”.

Volem estudiar si un fàrmac funcionarà per curar una malaltia determinada.

Però com podem provar el medicament sense posar en risc la salut de ningú?

Alerta! Els animals no serveixen, són massa diferents de nosaltres.

Ja ho tenim! Crearem un miniòrgan que funcioni igual que un de nostre. És a dir, farem una còpia en miniatura d'un cor, un fetge, un ronyó... Fins i tot, podrem fer que es connectin entre ells.

Per a crear aquest miniòrgan necessitarem un xip microfluídic. I què és això?

Un xip microfluídic és com una capseta on podem cultivar cèl·lules i incorporar-hi un lloc per poder viure-hi amb unes condicions molt controlades.

Ho farem a partir de cèl·lules mare. Aquestes cèl·lules les posarem en un hidrogel, que és un material biocompatible, és a dir, que no és tòxic per a les cèl·lules, i s'hi agafaran. L'hidrogel es solidificarà formant una estructura i les cèl·lules que estan adherides, adoptaran la forma que nosaltres voldrem tal i com es troben en el cos humà.

A més els xips microfluídics tenen uns canalets i tubets minúsculs on hi circulen fluids que aporten nutrients, oxigen i sang a les cèl·lules. Així, les cèl·lules poden créixer i fer les mateixes funcions que fan dins el cos.

D'aquesta manera nosaltres podrem veure tot el què li passa a un òrgan quan pateix una malaltia i podrem provar diferents medicaments per veure quin funciona millor per guarir-la. D'aquesta manera no caldrà fer-ho amb animals i quan ho provem amb persones, el medicament ja serà molt segur, estalviant diners i temps.

Per últim, ficarem un exemple de la manera que donem forma a l'hidrogel per enganxar-hi les cèl·lules. És com si féssim un pastís de pipetes de xocolata. i un dia li donem forma rectangular, un altre dia forma rodona o de cor..., segons el motlle que escollim. Les pipetes de xocolata serien les cèl·lules, tota la massa seria l'hidrogel i el motlle seria l'estamp. Quan fem la massa amb les pipetes al motlle, el pastís que surt del forn té la forma del motlle que hem escollit.

## 9. DOCUMENTAL: *MIRANT EL QUE NINGÚ VOL VEURE*

### 9.1 Introducció

Paral·lelament, en aquest treball de recerca hem inclòs una breu producció audiovisual tipus documental de caràcter social i testimonial que porta com a títol *Mirant el que ningú vol veure*. En el qual familiars, cuidadors especialitzats i metges de pacients afectats per la malaltia de l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ELA) expliquen la seva experiència i aporten els seus coneixements.

Hem intentat que aquest treball de recerca sigui multidisciplinari i que enfoqui el tema des de diferents perspectives. Per aquest motiu i tenint en compte que vaig cursar l'assignatura de Música i Cinema, la qual em va aportar els coneixements, la tècnica i les eines que es requereixen per fer un documental, hem decidit embarcar-nos en la producció d'aquest.

### 9.2. Objectius

Aquest audiovisual ha estat elaborat amb l'objectiu de conscienciar a la societat de la dura realitat que comporta patir la malaltia de l'ELA i conviure amb ella, divulgar-la i donar-li visibilitat. Així com, mostrar la vessant més humana, la finalitat de la ciència i la importància de seguir investigant per trobar una cura.

Perquè la ciència és una actitud i darrere una malaltia sempre hi ha vides humanes.

### 9.3. Metodologia

1. En primer lloc hem contactat amb els participants del documental.
2. En segon lloc hem preparat el guió: (plans, angles...), les preguntes de les entrevistes, el material (micròfon de solapa, càmera i trípod) i l'atretzo.
3. A continuació hem preparat i gravat les seqüències de transició (totes les imatges que apareixen han estat pensades a mida, creades i capturades per nosaltres).
4. Tot seguit hem enregistrat les entrevistes.
5. Finalment, hem editat el documental amb l'aplicació OpenShot.

## 9.4. Presentació

*Mirant el que ningú vol veure pretén commoure d'una manera original, emotiva, impactant i que no et deixarà indiferent donant veu a l'ELA. Una malaltia invisible que passa desapercebuda matant en silenci i demanant a crits avenços significatius per la seva cura.*

## GLOSSARI

**2D:** bidimensional.

**3D:** tridimensional.

**ASC:** cèl·lules mare adultes (Adult Stem Cells)

**Axó:** Prolongació citoplasmàtica de la neurona, generalment única i de longitud variable (d'uns microns fins a 1 m), que arrenca del pol oposat de les dendrites, i que condueix l'impuls nerviós.

**Bastides:** suport pel creixement i les funcions de les cèl·lules neuronals.

**BBB:** barrera hematoencefàlica (Blood–Brain Barrier)

**ECM:** matriu extracel·lular (Extracellular Matrix)

**ELA:** Esclerosi Lateral Amiotròfica

**ESC:** Cèl·lules mare embionàries (Embryonic Stem Cells)

**IBEC:** Institut de Bioenginyeria de Catalunya

**In situ:** Anàlisi d'un fenomen exactament al lloc i condicions on es desenvolupa. Sense desplaçament a un mitjà o lloc especial, i sense modificació de les condicionants usuals o naturals.

**In vitro:** experimentació en un ambient controlat fora d'un organisme viu.

**In vivo:** experimentació feta al teixit d'un organisme viu.

**iPSC:** cèl·lules mare pluripotents induïdes (induced Pluripotent Stem Cells)

**Modelar la malaltia:** generar un model, és a dir, reproduir o representar la malaltia *in vitro* mitjançant cèl·lules, òrgans o teixits involucrats en aquesta. De manera que mostren tots o alguns dels processos patològics que s'observen en la malaltia humana real i així, poder-la estudiar.

**NMJ:** Unió neuromuscular (Neuromuscular Junction)

**NSC:** Cèl·lules Mare Neurs (Neural Stem Cells)

**Sinapsi:** Regió de comunicació, per contigüitat, i de transmissió d'impulsos nerviosos per l'alliberament de determinades substàncies químiques (neurotransmissor) entre l'axó d'una neurona i les dendrites, el cos d'una altra neurona (*sinapsis nervioses*) o entre les terminacions nervioses d'una neurona motora i el múscul (*sinapsi neuromuscular*).

**SNC:** Sistema Nerviós Central

**SNP:** Sistema Nerviós Perifèric

**TSC:** Cèl·lula terminal de Schwann



## BIBLIOGRAFIA

BESSER,Rachel R.; BOWELES,Annie C.; ALASSAF, Ahmad; CARBONERO, Daniel et al. «Enzymatically crosslinked gelatin–laminin hydrogels for applications in neuromuscular tissue engineering ». *Biomaterials Science*: Royal Society of Chemistry, 16 desembre 2019, núm.2, p.16. [Consulta: 16/10/2021]

FRITSCHENA, Anna; BLAESER, Andreas. « Biosynthetic, biomimetic, and self-assembled vascularized Organ-on-a-Chip systems». *Biomaterials*: Elsevier, gener 2021, vol.268, art.120556. [Consulta: 22/08/2021]

GUOA, Xiufang; GONZALEZ, Mercedes; STANESCU,Maria; VANDERBURGHIC, Herman H.; HICKMA, James J. «Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system». *Biomaterials*: Elsevier, desembre 2011, vol.32, núm.36, p.9602-9611. [Consulta: 21/10/2021]

JODAT, Yasamin A; KANG, Min G.; KIAEE, Kiavash; KIM, Gyeong J.; MARTINEZ, Angel F.H.; ROSENKRANZ, Aliza et al. «Human-Derived Organ-on-a-Chip for Personalized Drug Development». *Current Pharmaceutical Design*: Bentham science, 2018, vol.24, núm.45, p.5471 – 5486. [Consulta: 12/07/2021]

KANKALA, Ranjith Kumar; WANG, Shi-Bin; CHEN, Ai-Zheng. «Microengineered Organ-on-a-chip Platforms towards Personalized Medicine». *Current Pharmaceutical Design*: Bentham science, 2018, vol.24, núm.45, p.5354 – 5366. [Consulta: 10/09/2021]

KIMURA, Hiroshi; SAKAI, Yasuyuki; FUJI, Teruo «Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, febrer 2018, vol.33, núm.1, p.43-48. [Consulta: 12/07/2021]

LIN, Dawn S Y; GUO, Feng Guo; ZHANG Boyang. «Modeling organ-specific vasculature with organ-on-a-chip devices». *Nanotechnology*., 5 novembre 2018, IOP Publishing, vol.30, núm.2. [Consulta 10/09/2021]

MARTÍNEZ ; ESCAMILLA-OCAÑAS; HERNÁNDEZ-TORRE. «Síntomas neurológicos extramotors en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica». *Sociedad española de neurología*, setembre de 2018, vol.33, núm.7, p.474-476. [Consulta: 12/07/2021]

MORA, Gerard. «¿Hasta qué punto el desconocimiento de la enfermedad condiciona a personas afectadas y a familiares?». Treball de recerca: SEK Catalunya, 16 setembre 2019. [Consulta: 2021]

ROTHBAUER, Mario; MROSSER, Julie; ZIRATH, HeleneZirath; ERTL, Peter. «Tomorrow today: organ-on-a-chip advances towards clinically relevant pharmaceutical and medical in vitro models». *Current Opinion in Biotechnology*: Elsevier, febrer 2019, vol.55, p.81-86. [Consulta 15/10/2021]

SOCIETAT CATALANA DE NEUROLOGIA. Diagnòstic i tractament de l'esclerosi lateral amiotròfica. Edició actualitzada 2020. 42p. (Protocol de tractament, 09). [Consulta: 16/5/2021]

XIOMARA FERNÁNDEZ-GABIBAY *ET AL.* «Bioengineered in vitro 3D model of myotonic dystrophy type 1 human skeletal muscle». *International Society for Biofabrication*, 26 abril 2021, IOP Publishing 13 035035, p.16. [Consulta: 05/11/2021]

## WEBGRAFIA

AZIZIPOUR, Neda; AVAZPOUR, Rahi; ROSENZWEIG, Derek H. Rosenzweig; SAWAN, Mohamad; AJJI, Abdellah. *Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip* [en línia]. *Micromachines*: MDPI, 18 juny 2020, vol.11, núm.6. <<https://doi.org/10.3390/mi11060599>> [Consulta: 08/08/2021]

BARCELLOS MACHADO, Carolina; PLUCHON, Perrine; HARLEY, Peter; RIGBY, Mark; GONZALEZ SABATER, Victoria. Et al. *In Vitro Modeling of Nerve–Muscle Connectivity in a Compartmentalized Tissue Culture Device* [en línia]. *Advanced Biosystems*: Wiley Online Library, juliol 2019, vol.3, núm.7. <<https://doi.org/10.1002/adbi.201800307>> [Consulta: 19/08/2021]

CONG, Ye Cong; HAN, Xiahe; WANG, Youping; CHEN, Zongzheng Chen et al. *Drug Toxicity Evaluation Based on Organ-on-a-chip Technology: A Review* [en línia]. *Micromachines*: MDPI, 3 abril 2020, vol.11, núm.4. <<https://doi.org/10.3390/mi11040381>> [Consulta: 02/07/2021]

DE JONGH, Rianne; SPIJKERS, Xandor M.; PASTEUNING-VUHMANN, Svetlana; VULTO, Paul et al. *Neuromuscular junction-on-a-chip: ALS disease modeling and read-out development in microfluidic devices* [en línia]. *Journal of neurochemistry*: Wiley Online Library, maig 2021, vol.157, núm.3, p. 393-412. <<https://doi.org/10.1111/jnc.15289>> [Consulta: 25/09/2021]

DING, Chizhu Ding; CHEN, Xiang Chen; KANG, Qinshu Kang; YAN, Xianghua. *Biomedical Application of Functional Materials in Organ-on-a-Chip* [en línia]. *Front. Bioeng. Biotechnol.*: 22 juliol 2020. <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00823>> [Consulta: 02/08/2021]

Fundació Catalana d'ELA Miquel Valls: <<https://linktr.ee/fmiquelvalls>> [Consulta: 2021]

Fundación ELA Francisco Luzón: <https://ffluzon.org/investigacion/ensayos/> [Consulta: 2021]

HOLLOWAY, Paul M.; WILLAIME-MORAWEK, Sandrine; SIOW, Richard Siow; BARBER, Melissa; OWNS, Róisín M. Et al. *Advances in microfluidic in vitro systems for neurological disease modeling* [en línia]. Journal of Neuroscience Research: Wiley Online Library, maig 2021, vol.99, núm.5, p. 1276-1307. <<https://doi.org/10.1002/jnr.24794>> [Consulta: 22/09/2021]

IRBLleida:<<https://www.irblleida.org/ca/recerca/publicacions/27experimentalneuromuscular-pathology>> [Consulta: 2021]

KIRSCH, Marline; BIRNSTEIN, Luise Birnstein; PEPELANOVA, Iliyana; HANDKE, Wiebke; RACH, Jessica; SELTSAM, Axel Seltsam; SCHEPER, Thomas, LAVRENTIEVA, Antonina. *Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties* [en línia]. Bioengineering: MDPI, 28 agost 2019, vol.6, núm.3. <<https://doi.org/10.3390/bioengineering6030076>> [Consulta: 25/11/2021]

MA, Chao; PENG, Yansong; LI, Hongtong; CHEN, Weiqiang. *Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development* [en línia]. Trends in Pharmacological Science: 16 desembre 2020, vol.42, núm.2, p.119-133. <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.009>> [Consulta: 3/06/2021]

MITTAL, Rahul Mittal; WOO, Frank W., CASTRO, Carlo S.; COHEN, Madeline A.; KARANXHA, Joana; MITTAL, Jeenu. *Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications* [en línia]. Cellular physiology: Wiley Online Library, juny 2019, vol.234, núm.6, p. 8352-8380. <<https://doi.org/10.1002/jcp.27729>> [Consulta: 02/07/2021]

OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. Advanced healthcare materials: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consulta: 2021]

RAMADANA, Qasem; ZOUROB, Mohammed. *Organ-on-a-chip engineering: Toward bridging the gap between lab and industry featured* [en línia]. AIP Biomicrofluidics: 14 juliol 2020, vol.14, núm.4. <<https://doi.org/10.1063/5.0011583>> [Consulta: 06/06/2021]

SALIBA, John Saliba; DAOU, Arij Daou; DAMIATI, Samar; SALIBA, Jessica; EL-SABBAN, Marwan; MAHANNA, Rami. *Development of Microplatforms to Mimic the In Vivo Architecture of CNS and PNS Physiology and Their Diseases* [en línia]. Genes: MDPI, 6 juny 2018, vol.9, núm.6. <<https://doi.org/10.3390/genes9060285>> [Consulta: 10/11/2021]

SUN, Mingyue; SUN, Xiaoting; WANG, Ziyuan; GUO, Shuyu; YU, Guangjiao; YANG, Huazhe. *Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue* [en línia]. Polymers: MDPI, 21 novembre 2018, vol.10, núm.11. <<https://doi.org/10.3390/polym10111290>> [Consulta: 25/11/2021]

THOMPSON, Clare L.; SU, Su; HEYWOOD, Hannah K.; KNIGHT, Martin M.; THORPE, Stephen D. *Mechanical Stimulation: A Crucial Element of Organ-on-Chip Models* [en línia]. Front. Bioeng. Biotechnol.: Nanobiotechnology, 10 desembre 2020. <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602646>> [Consulta: 17/09/2021]

WU, Q.; LIU, J.; WANG, X. *et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects* [en línia]. BioMed Eng OnLine: BMC, vol.19, núm.9, 12 febrer 2020. <<https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>> [Consulta: 09/07/2021]

ZLOKOVIC, Berislav V. *The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders* [en línia]. Neuron: 24 gener 2008, vol.57, núm.2, p. 178-201. <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>> [Consulta: 20/09/2021]

## FOTOWEBGRAFIA

### Imatges de la portada:

1. [https://lh3.googleusercontent.com/QJwGn\\_eEW7LOW253kW1Q1rjWkbg7ed6SUUUcOw6jJfRQdS7brB3le1A4VtaXiMVS9cxM1g=s157](https://lh3.googleusercontent.com/QJwGn_eEW7LOW253kW1Q1rjWkbg7ed6SUUUcOw6jJfRQdS7brB3le1A4VtaXiMVS9cxM1g=s157) [Consulta: 10/11/2021]
2. [https://lh3.googleusercontent.com/R3MpfhfkvJuYExQI1pgqWwA639CijVm-gQ\\_mpKGGJ\\_DN\\_Qy2bg-Ps5uRK9rnj2KMK0\\_rTw=s144](https://lh3.googleusercontent.com/R3MpfhfkvJuYExQI1pgqWwA639CijVm-gQ_mpKGGJ_DN_Qy2bg-Ps5uRK9rnj2KMK0_rTw=s144) [Consulta: 10/11/2021]
3. <https://lh3.googleusercontent.com/iOwYFm6Yx-Mv6NB8obUJLbzfz0DxqcbwOwVGJUn1sKg6tCigm2wIboQhQ4lVAEgcC6UFA=s162> [Consulta: 10/11/2021]
4. [https://lh3.googleusercontent.com/SVQkKYJaRq55-CkqiUf\\_7-qYZirZGvn9eY5kOfrA\\_sgTGiwUAad6miMINWYR9pHNgEtJFg=s151](https://lh3.googleusercontent.com/SVQkKYJaRq55-CkqiUf_7-qYZirZGvn9eY5kOfrA_sgTGiwUAad6miMINWYR9pHNgEtJFg=s151) [Consulta: 10/11/2021]
5. <https://lh3.googleusercontent.com/BNRILKqa8uLpiwtClxx0gjTY3PaY1nL5l8yQdd2ebgHVt-z8cLfvhsjxAI-utgzjzhW5Dw=s127> [Consulta: 10/11/2021]

### Figures:

Figura 1: <https://pharmedicals.files.wordpress.com/2019/03/microfluidic-chips.jpg>  
[Consulta: 5/12/2021]

Figura 2: <https://www.elflow.com/wp-content/uploads/2015/12/organ-on-a-chip-in-microfluidics.jpg> [Consulta: 6/12/2021]

Figura 3: RAMADANA, Qasem; ZOUROB, Mohammed. *Organ-on-a-chip engineering: Toward bridging the gap between lab and industry featured* [en línia]. AIP Biomicrofluidics: 14 julil 2020, vol.14, núm.4. <<https://doi.org/10.1063/5.0011583>> [Consulta: 06/06/2021]

Figura 4: RAMADANA, Qasem; ZOUROB, Mohammed. *Organ-on-a-chip engineering: Toward bridging the gap between lab and industry featured* [en línia]. AIP Biomicrofluidics: 14 julil 2020, vol.14, núm.4. <<https://doi.org/10.1063/5.0011583>> [Consulta: 06/06/2021]

Figura 5: KANKALA, Ranjith Kumar; WANG, Shi-Bin; CHEN, Ai-Zheng.

«Microengineered Organ-on-a-chip Platforms towards Personalized Medicine». *Current Pharmaceutical Design*: Bentham science, 2018, vol.24, núm.45, p.5354 – 5366.

[Consulta: 10/09/2021]

Figura 6: AZIZIPOUR, Neda; AVAZPOUR, Rahi; ROSENZWEIG, Derek H. Rosenzweig; SAWAN, Mohamad; AJJI, Abdellah. *Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip* [en línia]. *Micromachines*: MDPI, 18 juny 2020, vol.11, núm.6. <<https://doi.org/10.3390/mi11060599>> [Consulta: 08/08/2021]

Figura 7: MA, Chao; PENG, Yansong; LI, Hongtong; CHEN, Weiqiang. *Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development* [en línia]. *Trends in Pharmacological Science*: 16 desembre 2020, vol.42, núm.2, p.119-133 . <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.009>> [Consulta: 3/06/2021]

Figura 8: WU, Q.; LIU, J.; WANG, X. *et al.* *Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects* [en línia]. *BioMed Eng OnLine*: BMC, vol.19, núm.9, 12 febrer 2020. <<https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>> [Consulta: 09/07/2021]

Figura 9: WU, Q.; LIU, J.; WANG, X. *et al.* *Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects* [en línia]. *BioMed Eng OnLine*: BMC, vol.19, núm.9, 12 febrer 2020. <<https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>> [Consulta: 09/07/2021]

Figura 10: <https://www.fesemi.org/sites/default/files/images/informacion/info-pacientes/esclerosis-lateral-amiotrofica.jpg> [Consulta: 14/12/21]

Figura 11: <https://acortar.link/QXJSQ8> [Consulta: 16/12/2021]

Figura 12: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

Figura 13: ZLOKOVIC, Berislav V. *The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Neuron*: 24 gener 2008, vol.57, núm.2, p. 178-201. <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>> [Consulta: 20/09/2021]

Figura 14: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

Figura 15: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

Figura 16: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

Figura 17: BARCELLOS MACHADO, Carolina; PLUCHON, Perrine; HARLEY, Peter; RIGBY, Mark; GONZALEZ SABATER, Victoria. Et al. *In Vitro Modeling of Nerve–Muscle Connectivity in a Compartmentalized Tissue Culture Device* [en línia]. *Advanced Biosystems*: Wiley Online Library, juliol 2019, vol.3, núm.7. <<https://doi.org/10.1002/adbi.201800307>> [Consulta: 19/08/2021]

Figura 18: BARCELLOS MACHADO, Carolina; PLUCHON, Perrine; HARLEY, Peter; RIGBY, Mark; GONZALEZ SABATER, Victoria. Et al. *In Vitro Modeling of Nerve–Muscle Connectivity in a Compartmentalized Tissue Culture Device* [en línia]. *Advanced Biosystems*: Wiley Online Library, juliol 2019, vol.3, núm.7. <<https://doi.org/10.1002/adbi.201800307>> [Consulta: 19/08/2021]

Figura 19: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]

Figura 20: OSAKI, Tatsuya; SHIN, Yoojin; SIVATAHANU, Vivek; CAMPISI, Marco Campisi; KAMM, Roger D. *In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders* [en línia]. *Advanced healthcare materials*: Wiley Online Library, 24 gener 2018, vol.7, núm.2. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201700489>> [Consulta: 10/10/2021]



Figura 21: [https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/content/dam/sigmaaldrich/structure8/099/a\\_900496.eps/\\_jcr\\_content/renditions/a\\_900496-medium.png](https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/content/dam/sigmaaldrich/structure8/099/a_900496.eps/_jcr_content/renditions/a_900496-medium.png)

[Consulta: 14/12/2021]

Figura 22: [https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/content/dam/sigmaaldrich/structure6/006/mfcd00081876.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00081876-medium.png](https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/content/dam/sigmaaldrich/structure6/006/mfcd00081876.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00081876-medium.png) [Consulta: 14/12/2021]

Figura 23: Imatge pròpia.

Figura 24: Imatge pròpia.

Figura 25: Imatge pròpia.

Figura 26: Imatge pròpia.

Figura 27: Imatge pròpia.

Figura 28: Imatge pròpia.

Figura 29: Imatge pròpia.

Figura 30: Imatge pròpia.

Figura 31: XIOMARA FERNÁNDEZ-GABIBAY *ET AL.* «Bioengineered in vitro 3D model of myotonic dystrophy type 1 human skeletal muscle». *International Society for Biofabrication*, 26 abril 2021, IOP Publishing 13 035035, p.16. [Consulta: 10/12/2021]

The background features a complex, glowing network of interconnected nodes and lines. The nodes are primarily bright blue and cyan, while the connecting lines are a mix of orange and yellow. The overall effect is that of a digital or molecular structure, possibly representing a neural network or a data flow. The lighting is soft and ethereal, with a slight gradient from top to bottom.

# ANNEXOS

# ANNEX 1

## EXTENSIÓ FOTOGRÀFICA

### PRÀCTICA EXPERIMENTAL AL LABORATORI

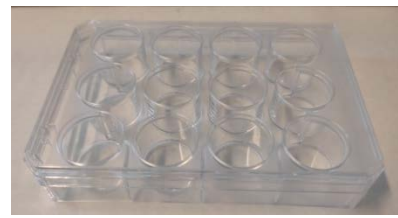
#### MATERIALS:



Làmpada reticulant UV



Placa calefactora i olleta



Plaques de cultiu cel·lular



Micropipeta i puntes  
(100-1000  $\mu$ L)



Pipetes Pasteur



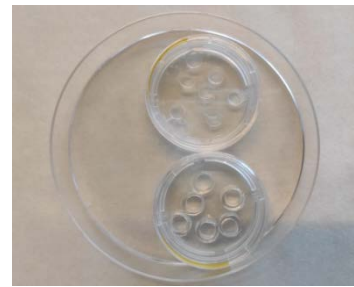
Termòmetre



Eppendorfs



Vasets de vidre



Estamps i plaques de petri



Vas de precipitats



Pinces



Lupa microscòpica binocular

## REACTIUS:



Aigua destil·lada



PEGDA



GelMA



LAP

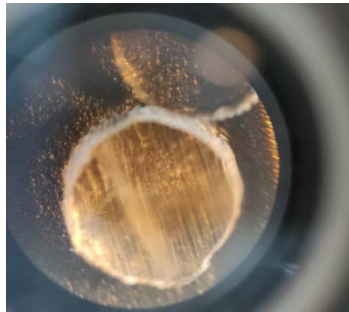
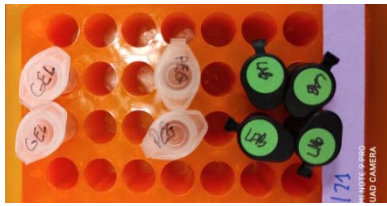
## PROCEDIMENT:



1. Mesurar la quantitat de GelMA(0,0500g), PEGDA(0,0500g) i LAP(0,0500g).

2. Preparar les dissolucions afegint 500 $\mu$ L a cada un dels eppendorfs que contenen GelMA, PEGDA o LAP.

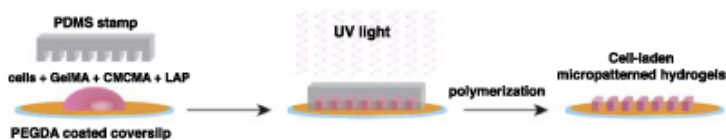
3. Dissoldre les substàncies que es troben en estat sòlid al bany maria i a temperatura constant de 50 °C durant 1 hora per tal d'obtenir les dissolucions.



4. Mesclar en un altre eppendorf diferent 500  $\mu$ L de GelMA amb 500  $\mu$ L de LAP i 500  $\mu$ L de PEGDA amb 500 $\mu$ L de LAP per separat.

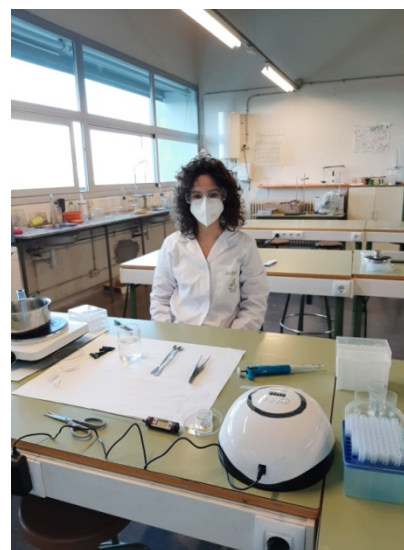
5. Dipositar una gota de cada solució a diferents pous de les plaques de cultiu i aplicar l'estamp amb l'ajuda de les pinces.

6. Exposar la placa que conté les mostres a la làmpada de llum UV durant diferents períodes o intervals de temps. Un cop retirada la placa amb les mostres de la làmpada UV, afegir un parell de gotes d'aigua destil·lada i treure l'estamp.



Esquema de l'efecte de l'estamp sobre l'hidrogel quan l'exposem a llum UV.

Font de la imatge: [10.1088/1758-5090/abf6ae](https://doi.org/10.1088/1758-5090/abf6ae)



Realitzant la pràctica al laboratori de l'institut.

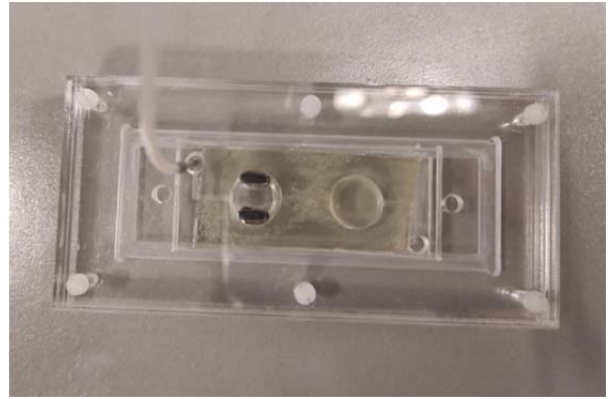
Totes les imatges que no figura la font, són pròpies.



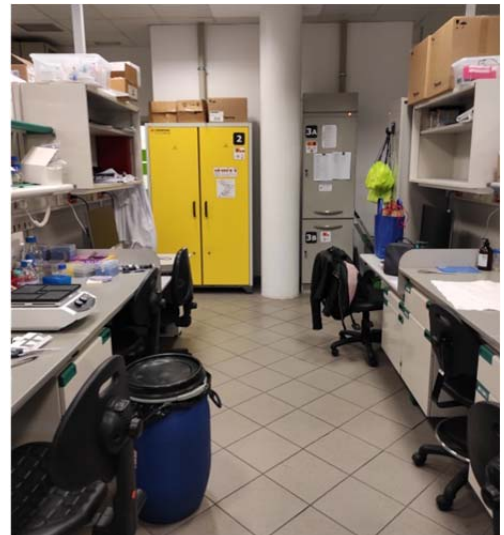
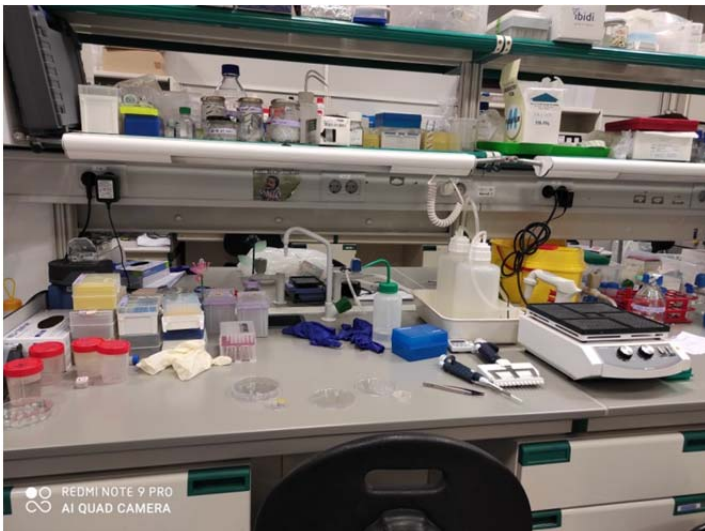
## VISITA A L'IBEC



Visita a l'IBEC.



Plataforma base d'un xip microfluídic.



Àrea de treball dels laboratoris.

## ANNEX 2

### PICTOGRAMES DE PERILLOSITAT DELS REACTIUS EMPRATS A LA PRÀCTICA EXPERIMENTAL

*SEGURETAT AL LABORATORI*

Polyethylene glicol diacrylate (PEGDA)



#### **Irritació cutània**

Advertiment dels efectes adversos que el producte pot provocar en dosis altes (irritació als ulls, gola, nas i pell, al·lèrgies cutànies, somnolència o vertigen).

Font de la imatge:

<https://experimentacioliure.files.wordpress.com/2012/02/exclamacio.gif>



#### **Corrosiu:**

El producte pot atacar o destruir metalls i causar danys irreversibles a la pell, ulls o altres teixits vius, en cas de contacte o projecció.

Font de la imatge:

<https://papelmatic.com/wp-content/uploads/2019/05/papelmatic-pictograma-producto-quimico-corrosivo.jpg>

## Gelatin methacrylate (GelMA)



### **Irritació cutània**

Advertiment dels efectes adversos que el producte pot provocar en dosis altes (irritació als ulls, gola, nas i pell, al·lèrgies cutànies, somnolència o vertigen).

Font de la imatge:

<https://papelmatic.com/wp-content/uploads/2019/05/papelmatic-pictograma-producto-quimico-corrosivo.jpg>



### **Perillós per aspiració**

Aquests productes poden arribar a l'organisme per inhalació i causar efectes negatius molt diversos i molt greus a llarg termini (efectes cancerígens, mutàgens, tòxics per a la reproducció, greus efectes sobre els pulmons, al·lèrgies respiratòres, etc).

Font de la imatge:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/21/GHS-pictogram-silhouette.svg/100px-GHS-pictogram-silhouette.svg.png>

## Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphinate (LAP)

No té pictogrames ja que no té perillositat.

## Aigua destil·lada

No té pictogrames ja que no té perillositat.



## **ANNEX 3**

### **GUIÓ DE LES PREGUNTES DE LES ENTREVISTES**

#### *Preguntes de entrevista a la psicòloga*

Quina acostuma a ser la primera reacció de l'afectat quan li diagnostiquen ELA?

Al llarg de tot el procés quins temors i sentiments té l'afectat?

Com afecta a un pacient d'ELA saber que no hi ha cura?

Com afecta un diagnòstic d'ELA a l'entorn familiar?

Com és el dia a dia a nivell psicològic de convivència amb un afectat d'ELA?

#### *Preguntes de l'entrevista al cuidador especialitzat*

Quin acostuma a ser el procés?

Quin paper tenen els cuidadors?

Quines són les cures principals que necessiten?

Què suposa que hi hagi una degeneració motora però no cognitiva?

Quin vincle es crea entre pacient i cuidador?

Quins són els temors que té el malalt?

Com us cuideu els cuidadors?

Hi ha suficients cuidadors especialitzats en ELA?

Descriure en una paraula com és conviure o patir amb l'ELA?

Com canvia l'ELA a les persones?

L'administració respon a la realitat social?

*Preguntes de l'entrevista al metge*

Què és l'ELA?

Quines conseqüències comporta i com canvia la vida de l'afectat?

Com s'arriba al diagnòstic?

Podria descriure en una sola paraula la malaltia de l'Ela.

Ha sentit a parlar de la tècnica de xips microfluídics? Creu que representarà un gran avenç per la medicina?

*Preguntes de l'entrevista als familiars d'afectat d'ELA*

Sabíeu que existia l'ELA? Què en sabíeu?

Quin factor va ser el desencadenant que us va fer pensar que allò no era normal i que havíeu d'anar al metge?

El diagnòstic va ser ràpid? I com hi van arribar?

Com va reaccionar l'Andreu?

Com va reaccionar la família?

Quins eren els seus màxims temors conforme avançava la malaltia? I els vostres?

Quina va ser la cronologia dels símptomes i com ho pal·liàveu? És a dir, quines són les cures principal que necessiten?

Què suposa que hi hagi una degeneració motora però no cognitiva?

De tot el procés quin moment va ser el més complicat d'afrontar?

A nivell emocional com ho porta la família? La família rep alguna mena d'ajuda per afrontar-ho?

Els cuidadors com es cuiden?

El fet de parlar-ne tant mentre dura el procés com un cop acabat us resulta terapèutic?

Creieu que hi ha prou recolzament a nivell d'administració? Les administracions responen a les necessitats reals?

Qui us va parlar de la fundació Miquel Valls i què us va suposar per vosaltres trobar-la?

De manera molt escueta llença un missatge a: afectats, família, administració, societat i sanitat.

Descriure en poques paraules com és conviure amb l'ELA.

Afegiu el què vulgueu. Teniu alguna cosa a dir.

Gerard: de manera breu a quines conclusions vas arribar a través del teu TdR: “¿Hasta qué punto el desconocimiento de la enfermedad condiciona a personas afectadas y a familiares?”

## ANNEX 4

### **GRABACIÓ DE L' ENTREVISTA AMB LA PSICÒLOGA CRISTINA GALIAN**

En un principi, teníem la intenció d'incloure al documental algunes explicacions sobre com afecta la malaltia de l'ELA a nivell psicològic. Així poder comptar també amb el punt de vista i el testimoni d'un professional en psicologia. A causa de la pandèmia, no hem pogut entrevistar a un/a psicòleg/a de forma presencial, però sí que ho hem fet de manera telemàtica. En aquest treball hem entrevistat a la psicòloga Cristina Galian de la Fundació Catalana d'ELA Miquel Valls.

Per qüestions de qualitat de d'àudio i imatge no hem pogut incloure cap seqüència de l'entrevista al documental.

Per aquest motiu, afegim l'enregistrament de l'entrevista en aquest codi QR en el qual es pot accedir.





