

Títol del treball:

**Disseny i fabricació de *scaffolds* de Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)
per al cultiu 3D de fibroblasts**

Estudiant: Jessica Martín Cañabate

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1920664@campus.udg.edu

Tutor: Pedro Salvador Sedano

Cotutor: Joaquim de Ciurana Gay

Empresa / institució: Laboratori GREP (Escola Politècnica Superior) i TargetsLab (Facultat de Medicina), Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor):

Nom del tutor: Pedro Salvador Sedano

Nom del cotutor: Joaquim de Ciurana Gay

Empresa/Institució: Laboratori GREP (Escola Politècnica Superior) i
TargetsLab (Facultat de Medicina), Universitat de Girona.

Correus electrònics:

- pedro.salvador@udg.edu
- quim.ciurana@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

RESUM

La neurocirurgia de la base del crani representa un repte important a causa de la dificultat per accedir-hi sense afectar a les estructures neurals i vasculars properes ni a la barrera entre el líquid cerebroespinal i el medi exterior. La cirurgia tradicional és una tècnica invasiva, consistent en perforar el crani (craniotomia), i arriscada perquè pot comprometre estructures importants. És per aquest motiu que han sorgit tècniques endoscòpiques, mínimament invasives, que aprofiten les obertures naturals, com el nas i la boca, per tal d'accedir a la base del crani, mitjançant la perforació del clivus.

El *background* d'aquest projecte és el disseny i la fabricació de pròtesis de Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) que puguin ser emprades per tancar la perforació del clivus, mitjançant l'enginyeria de teixits. D'aquesta manera, el present treball es basa en el disseny i la fabricació de *scaffolds* de PCL per al cultiu tridimensional de fibroblasts. Dins de la família de cèl·lules del teixit connectiu, els fibroblasts són els que presenten major facilitat per créixer en cultiu i major versatilitat per diferenciar-se en altres membres de la família.

Els *scaffolds* s'han dissenyat amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°) i diferents distàncies entre filaments (0.5, 0.7 i 0.9 mm). Aquests s'han generat amb la impressora RepRap BCN3D+ per tal d'avaluar els paràmetres òptims per al cultiu cel·lular tridimensional.

Els diferents dissenys han estat avaluats en cultiu cel·lular amb la línia fibroblàstica NIH/3T3. Els *scaffolds* amb un angle de deposició de 90° són els que han presentat una major viabilitat cel·lular, seguits dels *scaffolds* de 60° i, finalment, dels de 45°. D'altra banda, en els *scaffolds* amb una distància entre filaments de 0.5 mm s'ha observat un nombre de cèl·lules adherides als filaments superior als *scaffolds* de 0.7 i 0.9 mm, entre els quals no s'han apreciat diferències.

Els resultats obtinguts confirmen la facilitat dels fibroblasts per créixer sota qualsevol condició de cultiu. D'aquesta manera, el cultiu cel·lular tridimensional de fibroblasts en *scaffolds* de PCL fabricats amb la impressora RepRap BCN3D+ pot ser útil per generar complexos que mitjançant l'enginyeria de teixits poden tancar la perforació realitzada en el clivus, que serveix com a porta en les operacions de neurologia.

RESUMEN

La neurocirugía de la base del cráneo representa un reto importante debido a la dificultad de acceso sin afectar a otras estructuras neurales y vasculares cercanas ni a la barrera entre el líquido cerebroespinal y el medio externo. La cirugía tradicional es una técnica invasiva, consistente en perforar el cráneo (craneotomía), y arriesgada porque puede comprometer estructuras importantes. Es por esta razón que han surgido técnicas endoscópicas, mínimamente invasivas, que aprovechan las aperturas naturales, como la nariz y la boca, para acceder a la base del cráneo, mediante la perforación del clivus.

El *background* de este proyecto es el diseño y la fabricación de prótesis de Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) que puedan ser utilizadas para cerrar la perforación del clivus, mediante la ingeniería de tejidos. De esta manera, el presente trabajo se basa en el diseño y la fabricación de *scaffolds* de PCL para el cultivo tridimensional de fibroblastos. Dentro de la familia de células del tejido conectivo, los fibroblastos son los que presentan mayor facilidad para crecer en cultivo y mayor versatilidad para diferenciarse en otros miembros de la familia.

Los *scaffolds* se han diseñado con diferentes ángulos de deposición (90, 60 y 45°) y diferentes distancias entre filamentos (0.5, 0.7 y 0.9 mm). Estos han sido generados con la impresora RepRap BCN3D+ para evaluar los parámetros óptimos para el cultivo celular tridimensional.

Los diferentes diseños han sido evaluados en cultivo celular con la línea fibroblástica NIH/3T3. Los *scaffolds* con un ángulo de deposición de 90°, son los que han presentado una mayor viabilidad celular, seguidos de los *scaffolds* de 60° y, finalmente, de los de 45°. Por otro lado, en los *scaffolds* con una distancia entre filamentos de 0.5 mm se ha observado un número de células adheridas a los filamentos superior a los *scaffolds* de 0.7 y 0.9 mm, entre los cuales no se han apreciado diferencias.

Los resultados obtenidos confirman la facilidad de los fibroblastos para crecer bajo cualquier condición de cultivo. De esta manera, el cultivo celular tridimensional de fibroblastos en *scaffolds* de PCL fabricados con la impresora RepRap BCN3D+ puede ser útil para generar complejos que mediante la ingeniería de tejidos pueden cerrar la perforación del clivus, que sirve como puerta en las operaciones de neurología.

SUMMARY

Skull base neurosurgery means an important challenge due to the difficulty to reach this area without affecting nearby neural and vascular structures and the barrier between the cerebrospinal fluid and the external environment. Traditional surgery is an invasive technique, which consists in drilling a hole in the cranium (craniotomy), being dangerous as it can compromise some important structures. For this reason, endoscopic techniques have emerged. They use a minimally invasive procedure, taking advantage of the natural openings, as the nose and the mouth, to reach the skull base, by drilling a hole in the clivus.

The background of this study is Poly(ϵ -caprolactone) prostheses' design and manufacturing that can be used to close the drilled hole in the clivus, by tissue engineering. In this way, the current project is based on PCL scaffolds' design and manufacturing for three-dimensional fibroblast culture. In the connective-tissue cell family, fibroblasts are the easiest to grow in culture and the most versatile to differentiate into other members of the family.

Scaffolds have been designed with different deposition angles (90, 60 and 45°) and different distances between filaments (0.5, 0.7 and 0.9 mm). They have been produced using the RepRap BCN3D+ printer in order to evaluate the optimal parameters for the three-dimensional cell culture.

The different designs have been tested in cell culture with the fibroblastic line NIH/3T3. The scaffolds with a deposition angle of 90° are those which have showed the largest cell viability, followed by 60° scaffolds and, finally, by 45° ones. On the other hand, it has been observed a higher number of cells attached to filaments in scaffolds with a distance between filaments of 0.5 mm than in the other ones. No differences have been appreciated between 0.7 and 0.9 mm scaffolds.

The obtained results confirm the ease of fibroblasts to grow under any culture condition. In this way, three-dimensional fibroblast culture with PCL scaffolds manufactured with RepRap BCN3D+ printer could be useful to generate constructs that by tissue engineering could close the drilled hole in the clivus, which serves as a door in neurosurgery.

Disseny i fabricació de scaffolds de Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) per al cultiu 3D de fibroblasts

JESSICA MARTÍN CAÑABATE

Memòria del Treball Final de Grau

Cotutor: Dr. Joaquim De Ciurana

Tutor: Dr. Pedro Salvador Sedano

Grau en Biotecnologia

Juliol de 2016

Agraïments

En primer lloc, gràcies a en Marc Rabionet per la seva dedicació i paciència. He pogut veure l'admiració que sents per la feina que fas, i gràcies a tu l'he sentida jo també.

Gràcies al grup TargetsLab, en especial a la Sònia Palomeras, pel seu imprescindible suport durant la realització del treball. Gràcies per mostrar-me el camí.

Gràcies al grup GREP, especialment a la Isabel Bagudanch i a l'Antonio Guerra per ajudar-me a endinsar-me una mica en el món de l'enginyeria. Ha estat un plaer treballar amb vosaltres.

Gràcies a la Marina Vives pels coneixements d'estadística.

Gràcies també, per tutoritzar aquest treball i el pla d'acció al llarg del grau, al Dr. Pedro Salvador Sedano i a la Dra. Victòria de Los Angeles Salvadó Martín, respectivament.

Finalment, gràcies al Dr. Joaquim De Ciurana i a la Dra. Teresa Puig per confiar en mi i brindar-me l'oportunitat de realitzar aquest projecte. Sense vosaltres no hauria estat possible.

ÍNDIX

ÍNDIX.....	2
ÍNDIX DE FIGURES.....	4
ÍNDIX DE TAULES	6
1. INTRODUCCIÓ.....	7
1.1. Base del crani	7
1.1.1. Anatomia	7
1.1.2. Cirurgia de la base del crani	7
1.1.3. Clivus	8
1.2. Enginyeria de teixits	8
1.2.1. Fibroblasts	9
1.3. Fabricació de <i>scaffolds</i>	10
1.3.1. Tècniques	10
1.3.2. Materials	11
1.3.3. Paràmetres del procés	11
2. OBJECTIVES.....	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1. Disseny i fabricació de <i>scaffolds</i>	13
3.1.1. Disseny dels <i>scaffolds</i>	13
3.1.2. Fabricació dels <i>scaffolds</i>	14
3.2. Caracterització física dels <i>scaffolds</i>	16
3.3. Línia cel·lular i condicions de cultiu cel·lular	16
3.4. Cultiu cel·lular tridimensional en <i>scaffolds</i>	17
3.4.1. Esterilització	17
3.4.2. Sembra	17
3.4.3. Recompte cel·lular per tinció	18
3.4.4. Viabilitat cel·lular per assaig de MTT	18
3.5. Estadística.....	19
3.6. Criteris ètics o de sostenibilitat	19
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	20
4.1. Caracterització física dels <i>scaffolds</i>	20
4.2. Avaluació dels dissenys de <i>scaffolds</i>	21
4.2.1. Avaluació de l'angle de deposició	21
Recompte cel·lular per tinció	21

Viabilitat cel·lular per assaig de MTT	22
4.2.2. Avaluació de la distància entre filaments	23
Viabilitat cel·lular per assaig de MTT	24
5. CONCLUSIONS	26
6. BIBLIOGRAFIA	27

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Ossos que constitueixen la base del crani (extret <i>on-line</i> des de http://teachmeanatomy.info/head/osteology/skull/).	7
Figura 2. Vista superior de la base del crani, on es localitza el clivus (extret <i>on-line</i> des de http://radiologykey.com/skull-3/).	8
Figura 3. Família de cèl·lules del teixit connectiu. Les fletxes mostren les interconversions que tenen lloc en aquesta família (B. Alberts et al., <i>Molecular biology of the cell</i> 2002).	10
Figura 4. Paràmetres de disseny dels <i>scaffolds</i> . (A) Forma i diàmetre del <i>scaffold</i> (vista superior), (B) nombre de capes i gruix del <i>scaffold</i> (vista lateral), (C) distància entre filaments (d), diàmetre de filament (\emptyset) i angle de deposició (θ) (vista superior).	13
Figura 5. Vista superior dels dissenys dels <i>scaffolds</i> , juntament amb un detall de la mida dels porus. (A) Angle de deposició de 90°, (B) angle de deposició de 60°, (C) angle de deposició de 45°.	14
Figura 6. Impressora tridimensional RepRap BCN3D+.	16
Figura 7. <i>Scaffolds</i> impresos dissenyats amb diferents angles de deposició i la distància entre filaments fixada en 0.7 mm. (A) <i>Scaffold</i> amb angle de deposició de 90°, (B) <i>scaffold</i> amb angle de deposició de 60°, (C) <i>scaffold</i> amb angle de deposició de 45°.	20
Figura 8. <i>Scaffolds</i> impresos dissenyats amb diferents distàncies entre filaments i l'angle de deposició fixat en 90°. (A) <i>Scaffold</i> amb distància entre filaments de 0.5 mm, (B) <i>scaffold</i> amb distància entre filaments de 0.7 mm, (C) <i>scaffold</i> amb distància entre filaments de 0.9 mm. ..	20
Figura 9. Percentatge de porositat corresponent als <i>scaffolds</i> impresos, dissenyats amb distàncies entre filaments de 0.5, 0.7 i 0.9 mm. Es representen els nivells de significació estadística amb * ($p < 0.05$) i *** ($p < 0.001$).	20
Figura 10. Imatges de microscòpia òptica de cèl·lules de la línia cel·lular 3T3/NIH sembrades en <i>scaffolds</i> dissenyats amb diferents angles de deposició. (A) <i>Scaffold</i> de 90°, (B) <i>scaffold</i> de 60°, (C) <i>scaffold</i> de 45°. Les fletxes indiquen les cèl·lules adherides als filaments.	21
Figura 11. Percentatge de cèl·lules recomptades al cultiu tridimensional en <i>scaffolds</i> amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°) respecte el control adherent en dues dimensions. Els nivells de significació estadística són $p > 0.05$.	22
Figura 12. Percentatge de viabilitat cel·lular del cultiu tridimensional en <i>scaffolds</i> amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°) respecte el control adherent en dues dimensions. Els nivells de significació estadística són $p > 0.05$.	23

Figura 13. Imatges de microscòpia òptica de cèl·lules de la línia cel·lular 3T3/NIH sembrades en *scaffolds* dissenyats amb diferents distàncies entre filaments. (A) *Scaffold* de 0.5 mm, (B) *scaffold* de 0.7 mm, (C) *scaffold* de 0.9 mm. Les fletxes indiquen les cèl·lules adherides als filaments..... 24

Figura 14. Percentatge de viabilitat cel·lular del cultiu tridimensional en *scaffolds* amb diferents distàncies entre filaments (0.5, 0.7 i 0.9 mm) respecte el control adherent en dues dimensions. Es representen els nivells de significació estadística amb *** ($p < 0.001$)..... 24

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Paràmetres de disseny dels <i>scaffolds</i> per al seu posterior ús en cultiu cel·lular tridimensional.	13
Taula 2. Característiques dels porus dels diferents <i>scaffolds</i> dissenyats.....	14
Taula 3. Paràmetres de fabricació optimitzats dels <i>scaffolds</i> de PCL.	15
Taula 4. Principals característiques de la línia cel·lular NIH/3T3.	16

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Base del crani

1.1.1. Anatomia

La base del crani és una regió petita d'elevada complexitat, formada per dos ossos emparellats -frontal i temporal- i tres únics -etmoide, esfenoides i occipital- (**Figura 1**). Es troba dividida en tres compartiments o fosses: anterior, mitja i posterior. És una estructura que presenta una sèrie d'obertures que permeten el pas de la medulla espinal, els nervis sensorials i els vasos sanguinis, que proporcionen al cervell els nutrients i l'oxigen necessaris [1],[2].

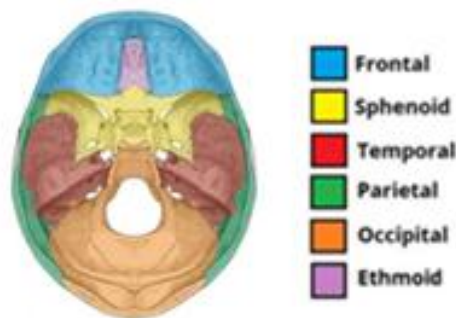


Figura 1. Ossos que constitueixen la base del crani (extret *on-line* des de <http://teachmeanatomy.info/head/osteology/skull/>).

1.1.2. Cirurgia de la base del crani

La cirurgia de la base del crani es realitza per eliminar tant tumors cancerosos com benignes, i anormalitats en la part inferior del cervell, la base del crani, o les poques vèrtebres superiors de la columna vertebral [3].

La base del crani es pot veure afectada per patologies congènites, traumes, infeccions, inflamació i tumors [2]. Alguns dels tumors o condicions que es poden tractar mitjançant la cirurgia de la base del crani són quists que es desenvolupen des del naixement, tumors causats per infeccions, tumors de la pitüitària, meningiomes, cordomes, neuràlgia trigèmica, craniofaringiomes, craniosinostosi, fístules de líquid cefaloraquídi, aneurisma cerebral i malformacions arteriovenoses [3].

La localització anatòmica de les lesions pot ser un repte important en la seguretat de l'accés quirúrgic, degut a la proximitat o la participació d'estructures neurals i vasculars crítiques i a la necessitat de preservar la barrera entre el líquid cefaloraquídi i el medi exterior [4].

En ser una àrea difícil d'observar i accedir-hi, la cirurgia de la base del crani hauria de ser un procediment endoscòpic mínimament invasiu. Tanmateix, en determinades circumstàncies, és necessària la cirurgia oberta tradicional, depenent del tipus de tumor que cal eliminar i de la seva localització. En la cirurgia endoscòpica els instruments s'insereixen a través de les obertures naturals del crani -el nas o la boca-, o es realitza una petita perforació a sobre de la cella. En canvi, la cirurgia tradicional requereix incisions en l'àrea facial i en el crani (craniotomia) [3],[4].

1.1.3. Clivus

El clivus és una part de la base del crani, un canal ossi localitzat entre el forat magne i el dors de la sella. Està format per la unió de la part posteroinferior de l'os esfenoides i la part anterosuperior de l'os occipital (**Figura 2**) [5], i es troba envoltat d'estructures neurovasculars del tronc encefàlic, així com artèries caròtides internes [6].

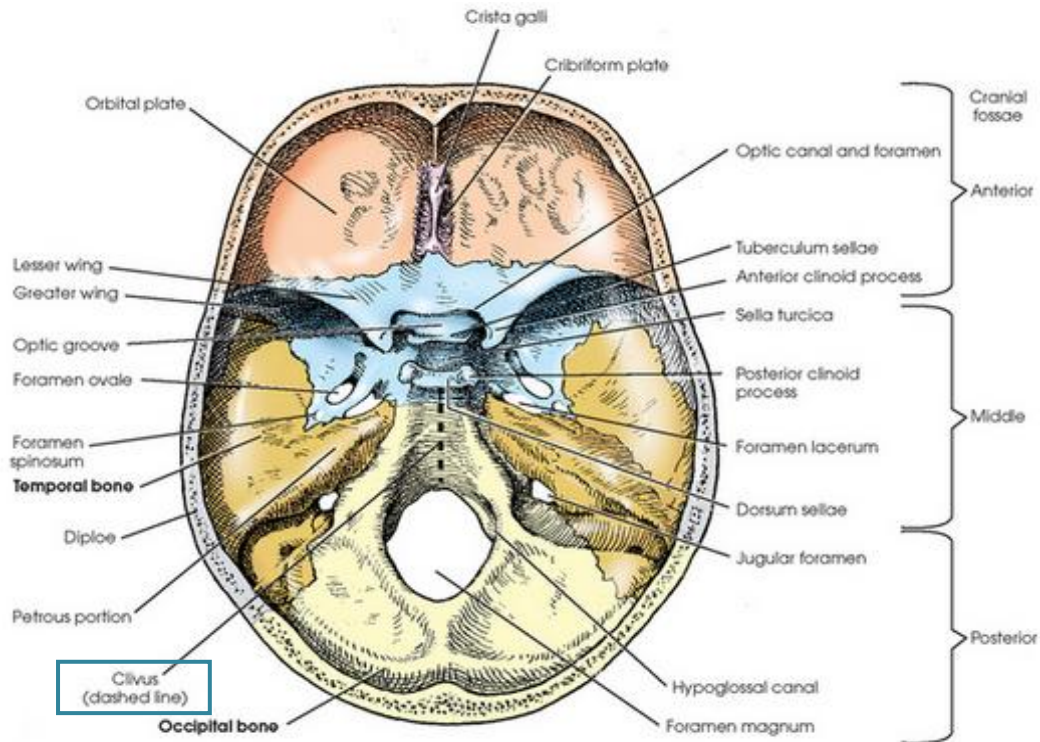


Figura 2. Vista superior de la base del crani, on es localitza el clivus (extret *on-line* des de <http://radiologykey.com/skull-3/>).

En les operacions de neurologia el clivus serveix com una "porta del crani", realitzant una perforació per tal d'accedir a la base del cervell. Tanmateix, aquesta obertura restant pot comportar complicacions postoperatòries. Per aquest motiu, la idea d'aquest projecte és que, posteriorment, l'accés sigui tancat mitjançant l'enginyeria de teixits.

1.2. Enginyeria de teixits

El transplantament ha estat, tradicionalment, la primera opció per a la reconstrucció de teixits i òrgans danyats, però la disponibilitat limitada d'òrgans i les reaccions immunitàries han comportat l'aparició de l'enginyeria de teixits o medicina regenerativa [7],[8].

Es tracta d'una disciplina que permet restaurar, mantenir o millorar la funció d'un òrgan o teixit a partir de tres materials clau: cèl·lules, matrius tridimensionals (*scaffolds*) i factors de creixement. La majoria de tipus cel·lulars humans són dependents d'ancoratge, de manera que els *scaffolds*, que són estructures polimèriques formades per un entramat de filaments, juguen un paper important en aquest procés, tant *in vitro* com *in vivo*, com a suports que proporcionen a les cèl·lules un ambient adequat perquè aquestes proliferin i duguin a terme les seves funcions. D'altra banda, els factors de creixement faciliten i promouen que les cèl·lules regenerin teixit nou [8],[9].

Les cèl·lules ideals per a l'enginyeria de teixits han de ser fàcils d'obtenir i expandir, conservar el seu fenotip, mantenir la seva funció i ser multipotencials per diferenciar-se o transdiferenciar-se en cèl·lules específiques de teixits i òrgans, així com no generar respostes immunitàries [7].

Donat que l'objectiu de l'enginyeria de teixits és dissenyar *scaffolds* capaços d'imitar les propietats naturals, aquests han de complir una sèrie de criteris [7],[10],[11]:

- Biocompatibilitat. El *scaffold* ha de ser biocompatible, de manera que les cèl·lules s'hi puguin adherir, dur a terme les seves funcions, migrar a la superfície i a través del *scaffold* i començar a proliferar abans de sintetitzar la nova matriu. Un cop implantat, el *scaffold* ha de provocar una reacció immunitària insignificant per tal d'evitar el rebuig per part de l'organisme.
- Biodegradabilitat. Amb el temps, les pròpies cèl·lules de l'organisme han de substituir el *scaffold* implantat, de manera que aquest ha de ser biodegradable per permetre que les cèl·lules sintetitzin la matriu extracel·lular. Els subproductes de degradació no han de presentar toxicitat i s'han de poder eliminar sense interferència amb altres òrgans. És important que la regeneració del teixit tingui lloc de forma sincronitzada amb la desaparició per degradació del biomaterial.
- Propietats mecàniques. El *scaffold* ha de presentar unes determinades propietats mecàniques en funció de la localització anatòmica en què serà implantat, que permetin resistir l'estrès local i mantenir l'estructura dels porus. D'altra banda, aquestes propietats han d'estar en equilibri amb la porositat, suficient per permetre el pas de les cèl·lules i la vascularització.
- Arquitectura. El *scaffold* ha de tenir una estructura de porus interconnectada i una porositat suficient per assegurar la proliferació cel·lular i una difusió de nutrients adequada, així com l'eliminació de productes residuals.

1.2.1. Fibroblasts

En el cos adult, moltes de les cèl·lules diferenciades s'agrupen en famílies en què els membres estan estretament relacionats pel seu origen o pel seu caràcter. Una d'aquestes famílies és la de les cèl·lules del teixit connectiu, que inclou fibroblasts, cèl·lules cartilaginoses i cèl·lules òssies, totes especialitzades en la secreció de la matriu extracel·lular de col·lagen i responsables de l'estructura arquitectònica del cos. També inclou adipòcits i cèl·lules de musculatura llisa. Es tracta d'una família important en què els membres no només estan relacionats, sinó que en alguns casos es poden interconvertir (**Figura 3**). Això fa que les cèl·lules del teixit connectiu tinguin un paper central en el suport i la reparació de gairebé tots els teixits i òrgans, i la capacitat d'adaptació del seu caràcter diferenciat és una característica important de les respostes a diferents tipus de dany.

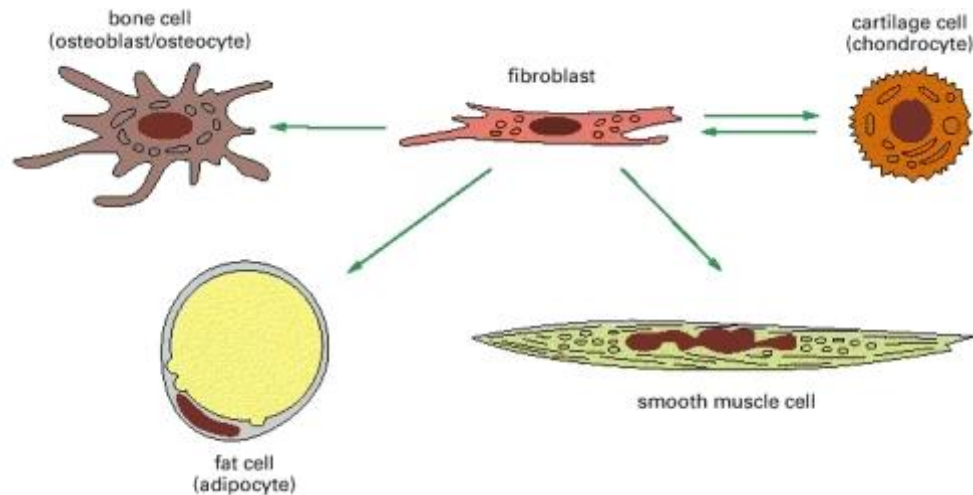


Figura 3. Família de cèl·lules del teixit connectiu. Les fletxes mostren les interconversions que tenen lloc en aquesta família (B. Alberts et al., *Molecular biology of the cell* 2002).

Aquestes transformacions es troben regulades per la composició de la matriu extracel·lular del voltant, per la forma cel·lular, i per hormones i factors de creixement.

Els fibroblasts, en concret, són d'especial interès en estudis de biologia cel·lular perquè són les cèl·lules que més fàcilment creixen en cultiu. A més, malgrat les incerteses que hi ha sobre les seves interconversions, sembla que són els membres més versàtils de la família de cèl·lules del teixit connectiu, presentant una elevada capacitat per diferenciar-se en altres membres de la família.

Els components de la matriu poden tenir una gran influència en la diferenciació d'aquestes cèl·lules. La matriu òssia conté elevades concentracions de moltes proteïnes senyal que poden afectar al comportament de les cèl·lules del teixit connectiu, com poden ser alguns membres de la família de factors de creixement transformant beta (TGF β). Aquests factors tenen una gran capacitat de regulació del creixement, la diferenciació i la síntesi de matriu de les cèl·lules del teixit connectiu, amb accions variables depenent de la cèl·lula i la combinació d'altres factors i components de la matriu.

Normalment, les pròpies cèl·lules sintetitzen la matriu que les envolta, necessària per al seu ancoratge i fixació, creant un entorn que reforça el seu estat diferenciat. D'aquesta manera, la matriu extracel·lular que secreta una cèl·lula també forma part de l'entorn de les cèl·lules veïnes, i això tendeix a fer que es diferenciïn de la mateixa manera [12].

1.3. Fabricació de *scaffolds*

1.3.1. Tècniques

La fabricació de *scaffolds* per al cultiu cel·lular tridimensional ha sorgit atès que un dels reptes actuals més importants de l'enginyeria de teixits és el desenvolupament de complexos de matrius i cèl·lules vives per tal de reparar i regenerar teixits danyats. La tècnica de fabricació additiva és una de les més utilitzades, ja que permet la fabricació, a escala micromètrica, de *scaffolds* personalitzats directament per al pacient, mitjançant el procés *Fused Filament Fabrication* (FFF) [13],[14].

Les impressores 3D, que utilitzen aquesta tècnica, són una de les opcions més viables i simples. Són màquines amb software de codi obert i baix cost que normalment empen materials termoplàstics. A més, es poden modificar fàcilment per tal de millorar la qualitat d'impressió dels productes tridimensionals [14].

El sistema *BioCell Printing* és un altre exemple de fabricació de *scaffolds* mitjançant tècniques additives, amb una possible aplicació en enginyeria de teixits [9]. A diferència de les impressores 3D, engloba les etapes de producció i cultiu dels *scaffolds* en un sol aparell, reduint la intervenció manual. D'aquesta manera, disminueix el risc de contaminació i augmenten la productivitat i la possibilitat d'aplicació clínica directa [15],[16].

Una altra tècnica molt utilitzada per a la fabricació de *scaffolds* és l'*Electrospinning*. Consisteix en la producció de fibres a escala nanomètrica, a partir d'una solució polimèrica que s'injecta a través d'una xeringa. Es requereix un elevat voltatge perquè les fibres es dipositin en la placa col·lectora [17],[18].

1.3.2. Materials

Les tècniques descrites empen diferents tipus de materials per a la fabricació dels *scaffolds*. Un dels més utilitzats per a posteriors aplicacions biomèdiques és la Poli(ϵ -caprolactona) (PCL). En ser biodegradable, biocompatible i lliure de colorant tòxic, i per la seva estabilitat estructural i propietats mecàniques, és un polímer àmpliament utilitzat per produir *scaffolds* per aplicacions en enginyeria de teixits [15],[17],[19].

Un altre material amb un gran potencial clínic és l'àcid polilàctic (PLA). Es tracta d'un polièster alifàtic termoplàstic, biodegradable i biocompatible [10],[20].

1.3.3. Paràmetres del procés

Les propietats del polímer emprat i la seva posterior aplicació determinen els paràmetres del procés. En primer lloc, l'arquitectura del *scaffold* depèn dels paràmetres de disseny. Aquests inclouen el diàmetre de filament, la distància entre filaments i l'angle de deposició, que es poden modificar segons el disseny desitjat i la seva posterior aplicació. D'altra banda, els paràmetres de fabricació controlen el procés d'impressió. Aquests inclouen la temperatura de l'extrusor i del llit, la velocitat de deposició i l'alçada de capa, i estan altament relacionats amb el material i les condicions de l'entorn -temperatura i humitat-. [9],[14],[19].

2. OBJECTIVES

The main goal of the present study is to develop scaffolds for three-dimensional fibroblast culture. This is a preliminary step to the implantation of a closure prosthesis in the hole of the drilled clivus in skull base surgery. To achieve this primary purpose, two secondary objectives have been defined:

- 1) PCL scaffolds' design and manufacturing using a 3D printer.
- 2) Study of three-dimensional fibroblast culture in PCL scaffolds.

3. METODOLOGIA

3.1. Disseny i fabricació de *scaffolds*

3.1.1. Disseny dels *scaffolds*

Els *scaffolds* s'han dissenyat de manera computacional mitjançant diferents programes informàtics. Per al disseny tridimensional s'ha emprat el programa *SolidWorks 2013* (Dassault Systèmes, SolidWorks Corp.), que treballa amb arxius CAD (*Computer-Aided Design*). Aquests dissenys s'han guardat en format STL (*Stereolithography*) i s'han transferit al programa *Slic3r V1.1.7* (Alessandro Ranellucci), que treballa amb arxius CAM (*Computer-Aided Manufacturing*).

Els *scaffolds* s'han dissenyat a partir dels paràmetres descrits prèviament en un projecte d'un dels membres del grup de recerca TargetsLab -Marc Rabionet Diaz- [21] (Taula 1).

Taula 1. Paràmetres de disseny dels *scaffolds* per al seu posterior ús en cultiu cel·lular tridimensional.

Paràmetres de disseny	
Forma	Circular
Diàmetre (mm)	19-20
Nombre de capes	8
Distància entre filaments (mm)	0.5, 0.7, 0.9
Diàmetre de filament (mm)	0.3
Gruix (mm)	2.4
Angle de deposició (°)	90, 60, 45

Tenint en compte que els assajos de cultiu cel·lular es realitzarien en plaques de 12 pous, amb un diàmetre de fons de 22.1 mm, els *scaffolds* presenten una forma circular, amb un rang de diàmetre de 19-20 mm (D). Aquesta variació és deguda principalment a la diferent disposició de les capes en els diferents dissenys. Altres paràmetres de disseny importants són la distància entre filaments (d), el diàmetre de filament (ϕ) i l'angle de deposició (θ) (Figura 4). La distància entre filaments és la distància entre els eixos que passen pel centre de dos filaments contigus en una mateixa capa. El diàmetre de filament és el diàmetre de les fibres que formaran el *scaffold*, i per tant, també correspon al gruix de cada capa. Aquest valor, juntament amb el nombre de capes, determinen el gruix total del *scaffold* (g). Finalment, l'angle de deposició és l'orientació que prenen les respectives capes. Els *scaffolds* dissenyats es mostren a la Figura 5.

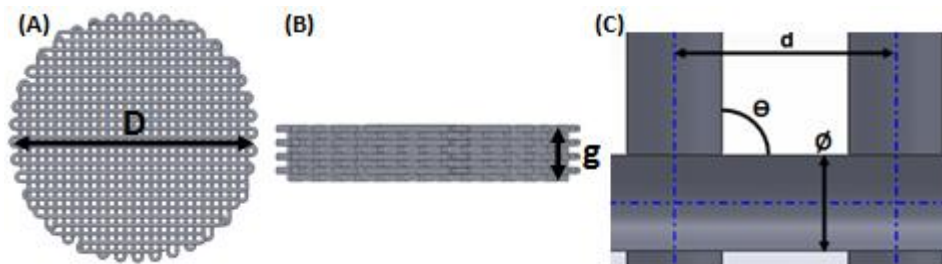


Figura 4. Paràmetres de disseny dels *scaffolds*. (A) Forma i diàmetre del *scaffold* (vista superior), (B) nombre de capes i gruix del *scaffold* (vista lateral), (C) distància entre filaments (d), diàmetre de filament (ϕ) i angle de deposició (θ) (vista superior).

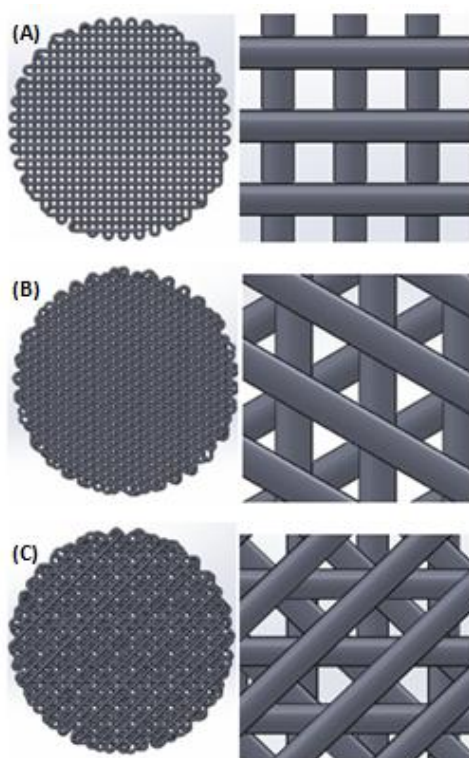


Figura 5. Vista superior dels dissenys dels *scaffolds*, juntament amb un detall de la mida dels porus. (A) Angle de deposició de 90°, (B) angle de deposició de 60°, (C) angle de deposició de 45°.

La mida dels porus difereix en els dissenys amb diferents angles de deposició i diferents distàncies entre filaments (Taula 2).

Taula 2. Característiques dels porus dels diferents *scaffolds* dissenyats.

Disseny del <i>scaffold</i>	Forma del porus	Àrea del porus (mm ²)
Angle de deposició (°)	90	Quadrada
	60	Triangles equilàters
	45	Triangles i polígons irregulars
Distància entre filaments (mm)	0.5	Quadrada
	0.7	Quadrada
	0.9	Quadrada

Els paràmetres **angle de deposició** i **distància entre filaments** s'han avaluat per separat. S'han dissenyat *scaffolds* de 90, 60 i 45°, amb una distància entre filaments fixada en 0.7 mm, i *scaffolds* de 0.5, 0.7 i 0.9 mm, fixant l'angle de deposició en 90°.

3.1.2. Fabricació dels *scaffolds*

El programa *Slic3r* s'ha utilitzat per establir els paràmetres de fabricació dels *scaffolds* i generar arxius en format G-code, que permeten controlar i regular la impressora per obtenir les peces. Finalment, mitjançant el simulador *Repetier-Host V1.0.4* (Host-World GmbH & Co. KG) s'ha comprovat que la fabricació sigui correcta.

Per a la producció dels *scaffolds* s'ha emprat fil d'aram de 3 mm de Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Perstorp, Malmö, Sweden) amb una densitat de 1145 Kg/m³. Es tracta d'un material biocompatible i biodegradable i no presenta toxicitat.

A partir de la bibliografia [14],[21] i dels valors per defecte del programa *Slic3r*, s'ha realitzat una reoptimització dels paràmetres de fabricació (**Taula 3**), per tal d'obtenir una impressió òptima dels *scaffolds*.

Taula 3. Paràmetres de fabricació optimitzats dels *scaffolds* de PCL.

Paràmetres de fabricació	
Alçada de capa (mm)	0.3
Velocitat de deposició (mm/s)	7
Temperatura de l'extrusor (°C)	85
Temperatura del llit (°C)	Scaffolds de 0.7 i 0.9 mm 35, 37 la primera capa
	Scaffolds de 0.5 mm 33, 31 la primera capa

Els paràmetres fixats han estat l'alçada de capa, la velocitat de deposició i la temperatura de l'extrusor i del llit. L'alçada de capa és la distància en l'eix Z que l'extrusor recorre per començar a imprimir una capa nova, de manera que correspon al gruix de cada capa. La velocitat de deposició és la velocitat en què es diposita el material polimèric imprès. Finalment, la temperatura de l'extrusor és la temperatura a la qual es fon el material per tal d'imprimir-lo, i la temperatura del llit és la temperatura de la superfície d'impressió.

La temperatura del llit de la primera capa impresa dels *scaffolds* dissenyats amb una distància entre filaments de 0.7 i 0.9 mm s'ha augmentat lleugerament per a la correcta deposició del material a la superfície d'impressió (37°C la primera capa i 35° la resta). D'altra banda, els *scaffolds* amb una distància entre filaments de 0.5 mm s'han imprès a una temperatura inferior per tal d'evitar la unió dels filaments de la primera capa impresa (31°C la primera i 33°C la resta de capes).

Per produir els *scaffolds* tridimensionals s'ha utilitzat la impressora RepRap BCN3D+ (**Figura 6**) (BCN3D Technologies, Barcelona, Spain). És una impressora 3D modular de codi obert i baix cost, que utilitza la tècnica additiva FFF (*Fused Filament Fabrication*), també anomenada *Fused Deposition Modeling* (FDM), consistent en la deposició del material en capes successives. El material es troba en una bobina, de la qual es va desenrotllant i s'introdueix en l'extrusor, que es troba a una temperatura superior a la de fusió del material. Aleshores, gràcies al moviment de l'extrusor en els tres eixos (X, Y i Z), el material extruït es diposita en el llit de la impressora, que es troba a una determinada temperatura.

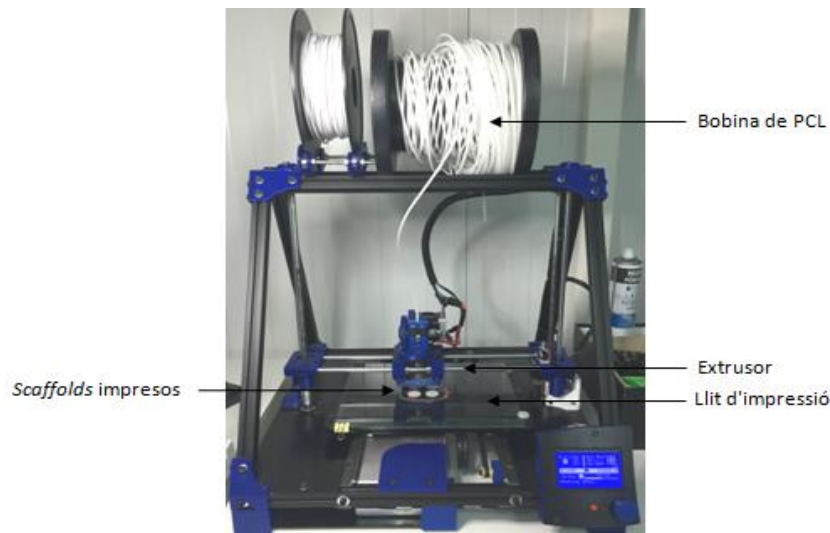


Figura 6. Impressora tridimensional RepRap BCN3D+.

La impressora RepRap BCN3D+ permet obtenir estructures geomètricament acurades i dissenys de *scaffolds* reproduïbles, degut a la seva capacitat per ser modificada i optimitzada per l'usuari [13][19].

3.2. Caracterització física dels *scaffolds*

Els *scaffolds* impresos s'han caracteritzat físicament mesurant el seu diàmetre, gruix i pes. Per a les mesures de diàmetre i gruix s'ha emprat un micròmetre (Limit, rang de mesura: 0-25 mm, precisió 0.01 mm), i per al pes una balança analítica (Sartorius, Göttingen, Germany). A partir de les dades obtingudes s'ha calculat la porositat dels *scaffolds*, mitjançant la següent equació:

$$\text{Porositat (\%)} = \frac{V_t - \frac{w}{\varphi}}{V_t} * 100,$$

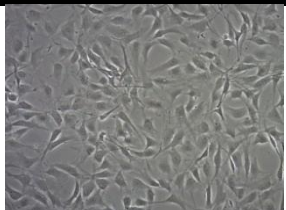
on V_t és el volum sòlid del *scaffold* i $\frac{w}{\varphi}$ el volum de material extruït. El valor del volum sòlid s'ha calculat considerant que els *scaffolds* tenen una forma cilíndrica, mitjançant la següent fórmula: $V = \pi r^2 h$. El volum extruït s'ha obtingut a partir del pes del *scaffold* (w) i la densitat del material (φ).

3.3. Línia cel·lular i condicions de cultiu cel·lular

Per al cultiu cel·lular s'ha utilitzat la línia NIH/3T3 (Taula 4). Es tracta d'una línia cel·lular fibroblàstica de ratolí provinent de l'*American Culture Type Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA).

Taula 4. Principals característiques de la línia cel·lular NIH/3T3.

Línia cel·lular NIH/3T3	
Origen	<i>Mus musculus</i> , ratolí
Teixit	Embrionari
Tipus cel·lular	Fibroblast
Morfologia	Fibroblast
Condicions de creixement	Adherent



S'ha escollit aquesta línia per a les futures aplicacions d'aquest projecte, consistent en avaluar el cultiu cel·lular tridimensional de fibroblasts, per a la seva posterior aplicació en enginyeria de teixits.

El cultiu cel·lular de la línia NIH/3T3 s'ha realitzat amb medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, Paisley, United Kingdom), suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 2% de L-glutamina¹, 1% de sodi piruvat, 50 U/mL de penicil·lina i 50 μ g/mL d'estreptomicina (HyClone, South Logan, UT, USA), i mantingut a 37°C, amb un 95% d'aire i un 5% de CO₂.

3.4. Cultiu cel·lular tridimensional en *scaffolds*

3.4.1. Esterilització

Els *scaffolds* s'han esterilitzat amb una solució d'etanol al 70% durant 12 hores. Transcorregut aquest temps, s'han rentat amb tampó fosfat salí (PBS; Gibco, Paisley, United Kingdom) i s'han irradiat amb llum ultraviolada durant 30 minuts. Finalment, els *scaffolds* s'han transferit a una nova placa de 12 pous per al cultiu cel·lular tridimensional.

3.4.2. Sembra

Per a la sembra dels *scaffolds* s'han emprat plaques de 12 pous (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) de poliestirè tractat. És un bon material perquè té claredat òptica, és fàcil de modelar i es pot esterilitzar per radiació. Tanmateix, és hidrofòbic i dificulta l'adhesió cel·lular. Per aquest motiu, és modificat per tal que la superfície sigui més hidrofílica i permeti el creixement cel·lular adherent [22]. D'altra banda, les plaques de poliestirè no tractat no són adequades per al cultiu cel·lular no adherent perquè poden permetre l'adhesió d'algunes cèl·lules, degut a la seva esterilització per irradiació.

En base al projecte d'un dels membres del grup de recerca [21] s'ha decidit realitzar el cultiu cel·lular tridimensional en condicions no adherents, per obtenir un major nombre de cèl·lules adherides als *scaffolds*. Les condicions no adherents s'han aconseguit recobrint les superfícies de cultiu de les plaques de poliestirè tractat amb poli(2-hidroxietil metacrilat) (pHEMA; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), un polímer altament hidrofòbic i amb càrrega neutra, que evita l'adhesió cel·lular al fons del pou. Transcorreguts uns 4-5 dies, temps suficient perquè el pHEMA s'assequés, les plaques s'han esterilitzat per radiació ultraviolada durant 30 minuts.

En cada experiment s'ha realitzat un control de sembra en dues dimensions, per als quals s'han emprat plaques de poliestirè tractat, sense recobrir la superfície de cultiu amb pHEMA, per tal de tenir condicions d'adherència.

¹ El cultiu cel·lular de la línia NIH/3T3 es va realitzar, inicialment, amb medi DMEM suplementat amb 10% de FBS, **1% de L-glutamina**, 1% de sodi piruvat, 50 U/mL de penicil·lina i 50 μ g/mL d'estreptomicina. En observar una taxa de creixement molt lenta, es va incrementar la concentració de L-glutamina del medi a un **2%**, obtenint, d'aquesta manera, un creixement més ràpid. Aquestes concentracions corresponen al medi DMEM recomanat per l'ATCC.

Els *scaffolds* s'han sembrat, gota a gota al centre de la seva superfície, amb 250 µL d'una suspensió de 40,000 cèl·lules resuspeses en medi de cultiu DMEM. S'han incubat durant 3 hores facilitant, d'aquesta manera, l'adhesió cel·lular. Aleshores, s'han afegit 1.5 mL de medi, i s'han incubat durant 72 hores. En els controls en dues dimensions s'ha sembrat la mateixa densitat cel·lular, directament sobre el pou.

3.4.3. Recompte cel·lular per tinció

Després de la incubació durant 72 hores del cultius cel·lulars en *scaffolds* i en dues dimensions, en placa de 12 pous, s'ha aspirat el medi amb bomba de buit, s'han realitzat dos rentats amb 1.5 mL de PBS per tal d'eliminar el medi restant, i s'ha tornat a aspirar. Seguidament, s'ha afegit 1.5 mL de tripsina (DD Biolab S.L., Barcelona, Spain) i s'han incubat durant 1 hora. Transcorregut aquest temps, s'han afegit 3 mL de medi DMEM, s'ha resuspès i s'ha recollit el volum total, el qual s'ha centrifugat a 15,000 rpm durant 5 minuts. El *pellet* obtingut s'ha resuspès en 100 µL de medi.

El recompte del nombre de cèl·lules adherides s'ha realitzat mitjançant la tinció cel·lular amb blau de tripà, utilitzant la cambra de recompte de Neubauer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Germany) i el microscopi òptic invertit. El blau de tripà és un colorant que només penetra dins les cèl·lules mortes, ja que aquestes tenen la membrana plasmàtica alterada. D'aquesta manera, les cèl·lules vives tenen una aparença refringent. El nombre de cèl·lules adherides s'ha calculat a partir de la següent equació:

$$n^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules adherides} = \text{mitjana del } n^{\circ} \text{ cèl} \cdot \text{lules vives a cada cambra} * FD * 10,000 * V,$$

tenint en compte el nombre de cèl·lules vives a cada camp de la cambra, la dilució feta amb el blau de tripà (*FD*), el volum de la cambra (10,000 mm³) i el volum en què s'ha resuspès el *pellet* (*V*).

3.4.4. Viabilitat cel·lular per assaig de MTT

Com a alternativa al recompte cel·lular per tripsinització, també s'ha realitzat un assaig de viabilitat cel·lular per MTT (bromur de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazòlic). Aquest mètode es basa en la capacitat de les cèl·lules vives, metabòlicament actives, d'incorporar i reduir la sal de tetrazolil MTT i formar formazà, que secreten al medi de cultiu, i precipita formant cristalls. La intensitat de color observada, corresponent al formazà, és directament proporcional al nombre de cèl·lules vives.

Després de la incubació durant 72 hores del cultiu cel·lular en *scaffolds* i en dues dimensions, en placa de 12 pous, s'ha aspirat el medi amb bomba de buit, s'han addicionat 1.5 mL de PBS, s'ha tornat a aspirar i s'ha afegit 1 mL de medi DMEM. Seguidament, s'han resuspès 100 µL de MTT i la placa s'ha incubat durant 2 hores i 30 minuts. Aleshores, s'ha aspirat el medi i s'han addicionat 2 mL de dimetilsulfòxid (DMSO), per dissoldre els cristalls de formazà formats per les cèl·lules viables. La placa ha estat 1 hora en agitació (140 rpm) per tal d'aconseguir solucions homogènies. Per a la lectura, s'han agafat alíquotes de 100 µL i s'han dipositat en una placa de 96 pous. Finalment, l'absorbància s'ha determinat a 570 nm mitjançant un lector de plaques de 96 pous.

3.5. Estadística

Els experiments s'han realitzat, com a mínim, per triplicat i les dades s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. Els resultats s'han analitzat mitjançant el test *t-student*, essent els nivells estadísticament significatius $p < 0.05$ (indicat com *), $p < 0.01$ (indicat com **) i $p < 0.001$ (indicat com ***).

3.6. Criteris ètics o de sostenibilitat

Per a la producció dels *scaffolds* s'ha utilitzat PCL, que és un polímer biodegradable. A més, la impressora RepRap BCN3+ pot fabricar les seves pròpies peces, de manera que si alguna peça es trenca, no cal comprar-ne una altra.

Al laboratori s'han reciclat els materials el màxim possible, sempre i quan no hi hagués risc de contaminació, ni es perjudiqués el creixement de les cèl·lules. Les plaques de cultiu cel·lular, per exemple, s'han reciclat fins a un màxim de tres vegades.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Caracterització física dels *scaffolds*

Els *scaffolds* dissenyats amb angles de deposició de 90°, 60° i 45° (Figura 7) tan sols difereixen en la disposició de les diferents capes. D'aquesta manera, els tres dissenys presenten el mateix volum sòlid i volum de material extruït i, per tant, la mateixa porositat (veure 4.2. Caracterització física dels *scaffolds*).

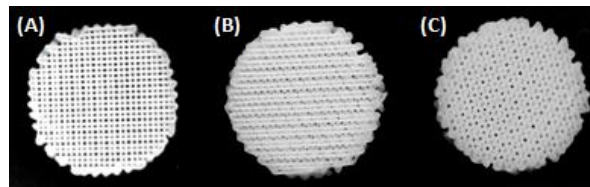


Figura 7. *Scaffolds* impresos dissenyats amb diferents angles de deposició i la distància entre filaments fixada en 0.7 mm. (A) *Scaffold* amb angle de deposició de 90°, (B) *scaffold* amb angle de deposició de 60°, (C) *scaffold* amb angle de deposició de 45°.

D'altra banda, els *scaffolds* dissenyats amb distàncies entre filaments de 0.5, 0.7 i 0.9 mm (Figura 8) varien en la quantitat de material extruït, de manera que presenten porositats diferents (Figura 9).

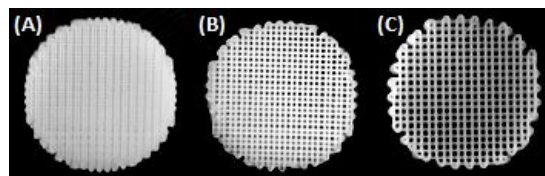


Figura 8. *Scaffolds* impresos dissenyats amb diferents distàncies entre filaments i l'angle de deposició fixat en 90°. (A) *Scaffold* amb distància entre filaments de 0.5 mm, (B) *scaffold* amb distància entre filaments de 0.7 mm, (C) *scaffold* amb distància entre filaments de 0.9 mm.

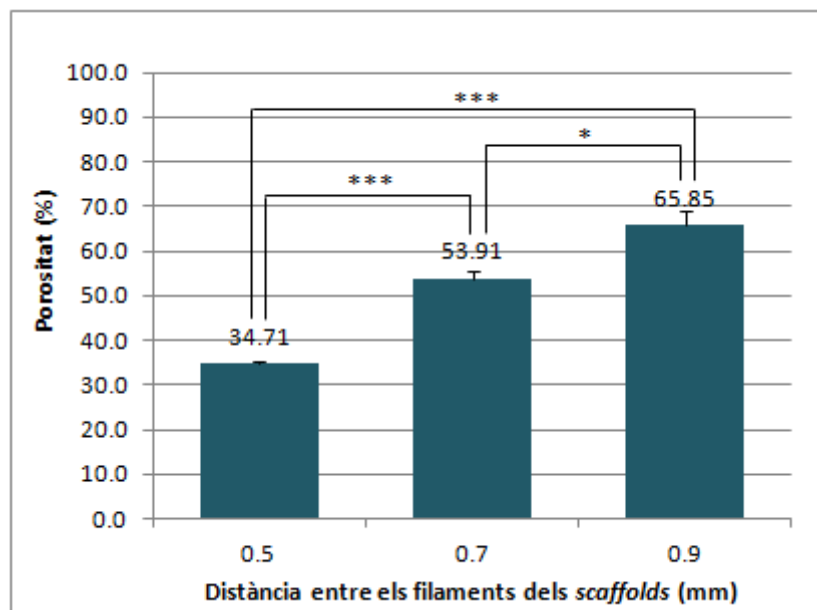


Figura 9. Percentatge de porositat corresponent als *scaffolds* impresos, dissenyats amb distàncies entre filaments de 0.5, 0.7 i 0.9 mm. Es representen els nivells de significació estadística amb * ($p < 0.05$) i *** ($p < 0.001$).

Els *scaffolds* amb una distància entre filaments de 0.5 mm presenten una porositat inferior degut a que la quantitat de PCL extruït és major. D'aquesta manera, els *scaffolds* amb una distància entre filaments de 0.7 mm tenen una porositat intermitja. Mentre que els *scaffolds* dissenyats amb una distància entre filaments de 0.9 mm, impresos amb una menor quantitat de material, presenten una porositat més elevada.

4.2. Avaluació dels dissenys de *scaffolds*

Els experiments s'han realitzat amb l'objectiu d'avaluar els dissenys dels *scaffolds* de diferents angles de deposició i diferents distàncies entre filaments. Per tal d'efectuar-los s'han utilitzat plaques de 12 pous de poliestirè tractat. El cultiu tridimensional s'ha realitzat en condicions no adherents amb pHEMA, juntament amb els respectius controls en dues dimensions, en condicions d'adherència.

4.2.1. Avaluació de l'angle de deposició

En el primer bloc d'experiments s'han avaluat els dissenys dels *scaffolds* amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°), amb una distància entre filaments fixada en 0.7 mm. Transcorregudes les 72 hores d'incubació, s'han obtingut imatges del cultiu tridimensional amb el microscopi òptic invertit, de manera que només s'han visualitzat les cèl·lules adherides a la part inferior o lateral dels filaments (**Figura 10**).

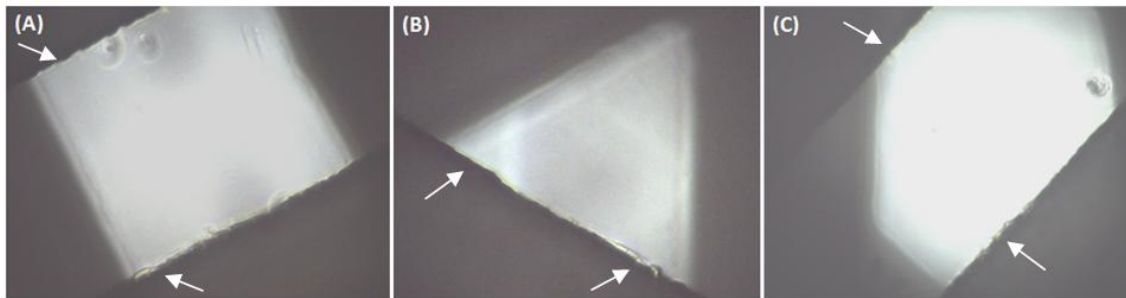


Figura 10. Imatges de microscòpia òptica de cèl·lules de la línia cel·lular 3T3/NIH sembrades en *scaffolds* dissenyats amb diferents angles de deposició. **(A)** Scaffold de 90°, **(B)** scaffold de 60°, **(C)** scaffold de 45°. Les fletxes indiquen les cèl·lules adherides als filaments.

En els tres dissenys s'ha observat, a priori, una quantitat similar de cèl·lules adherides als filaments.

Recompte cel·lular per tinció

Les cèl·lules, tant del control en dues dimensions com del cultiu tridimensional en *scaffolds*, s'han tripsinitzat per tal de dur a terme el recompte cel·lular (**Figura 11**).

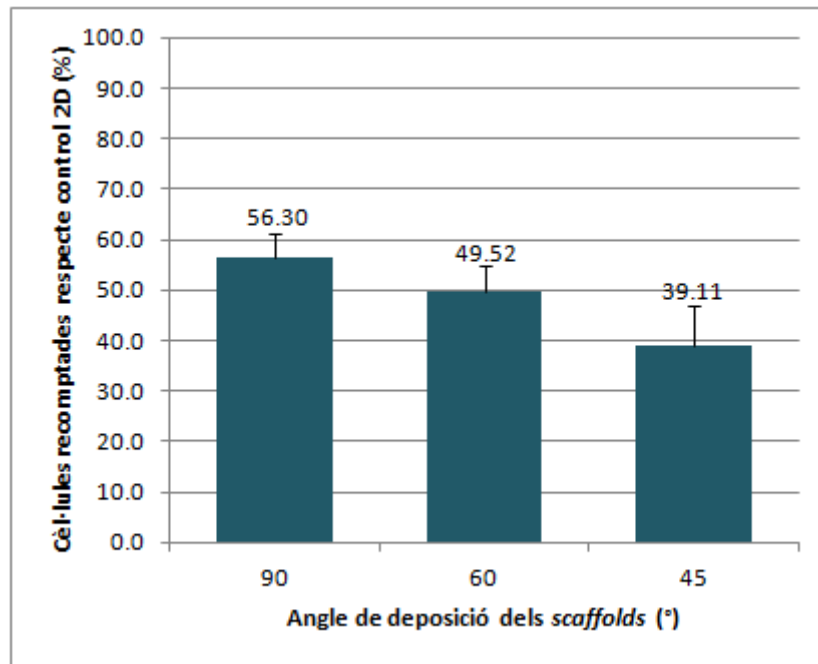


Figura 11. Percentatge de cèl·lules recomptades al cultiu tridimensional en *scaffolds* amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°) respecte el control adherent en dues dimensions. Els nivells de significació estadística són $p > 0.05$.

En el recompte cel·lular del cultiu tridimensional en *scaffolds* s'observa una tendència clara en què els *scaffolds* dissenyats amb un angle de deposició de 90° presenten un major nombre de cèl·lules adherides, seguits dels *scaffolds* de 60°, i finalment dels de 45°. Tanmateix, les diferències no són estadísticament significatives ($p=0.41$ entre 90° i 60°, $p=0.12$ entre 90° i 45°, i $p=0.33$ entre 60° i 45°).

Aquests resultats poden estar influenciats pel mètode de recompte, ja que la mida de porus dels *scaffolds* dissenyats amb angle de deposició de 60 i 45° dificulten que es tripsinitzin i recullin totes les cèl·lules per al recompte cel·lular. Per aquest motiu, s'ha avaluat el cultiu amb un mètode alternatiu.

Viabilitat cel·lular per assaig de MTT

L'avaluació del disseny dels *scaffolds* amb diferents angles de deposició també s'ha realitzat mitjançant un assaig de viabilitat cel·lular per MTT (**Figura 12**).

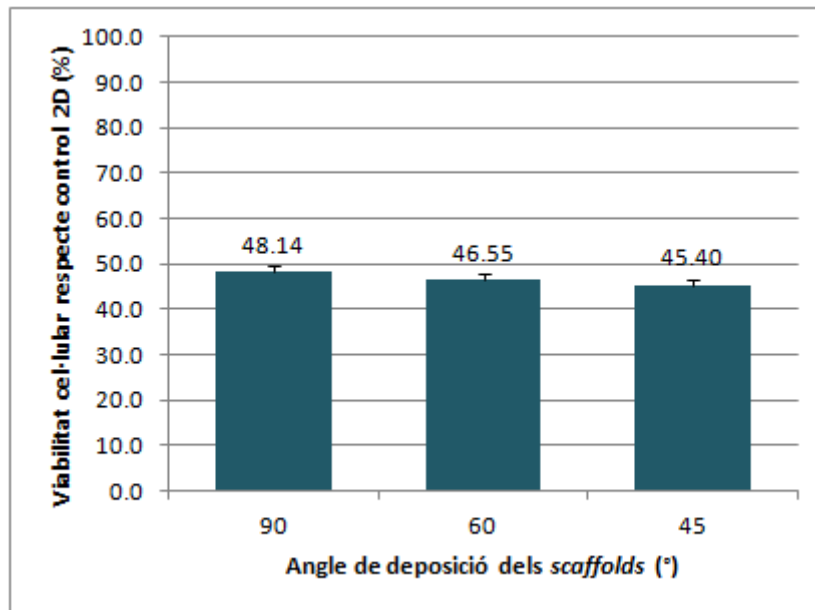


Figura 12. Percentatge de viabilitat cel·lular del cultiu tridimensional en *scaffolds* amb diferents angles de deposició (90, 60 i 45°) respecte el control adherent en dues dimensions. Els nivells de significació estadística són $p > 0.05$.

En l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT els diferents dissenys tampoc presenten diferències estadísticament significatives en el percentatge de viabilitat cel·lular ($p=0.38$ entre 90° i 60°, $p=0.14$ entre 90° i 45°, i $p=0.49$ entre 60° i 45°) i es confirma la tendència observada en el recompte cel·lular, malgrat que d'una manera més atenuada.

La tendència observada és més pronunciada en el recompte cel·lular, segurament degut a l'entramat dels *scaffolds*, ja que els porus de mida més petita poden dificultar la tripsinització de les cèl·lules i que es recullin totes per al recompte cel·lular. Per tant, l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT seria un mètode més precís a l'hora d'avaluar el cultiu tridimensional en *scaffolds* de PCL.

En ambdós casos, els resultats semblen indicar que el cultiu cel·lular tridimensional es veu afavorit quan els *scaffolds* presenten una major mida de porus.

4.2.2. Avaluació de la distància entre filaments

En el segon bloc d'experiments s'han avaluat els dissenys dels *scaffolds* amb diferents distàncies entre filaments (0.5, 0.7 i 0.9 mm). En vista dels resultats obtinguts prèviament en l'avaluació de l'angle de deposició, s'ha fixat aquest en 90°. Transcorregudes les 72 hores d'incubació, s'han obtingut imatges del cultiu tridimensional amb el microscopi òptic invertit, de manera que només s'han visualitzat les cèl·lules adherides a la part inferior o lateral dels filaments (**Figura 13**).

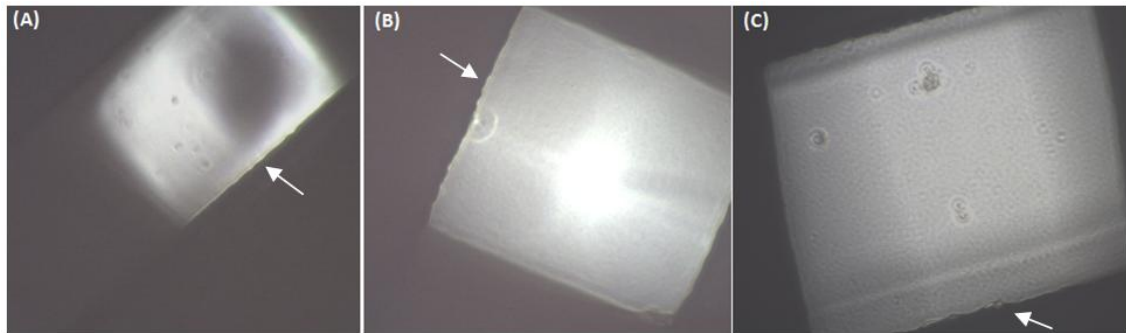


Figura 13. Imatges de microscòpia òptica de cèl·lules de la línia cel·lular 3T3/NIH sembrades en *scaffolds* dissenyats amb diferents distàncies entre filaments. **(A)** *Scaffold* de 0.5 mm, **(B)** *scaffold* de 0.7 mm, **(C)** *scaffold* de 0.9 mm. Les fletxes indiquen les cèl·lules adherides als filaments.

En l'observació microscòpica dels *scaffolds* sembrats no s'aprecien diferències d'adhesió cel·lular entre els tres dissenys.

Viabilitat cel·lular per assaig de MTT

En vista de que mitjançant el recompte cel·lular per tinció i l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT s'obtenen resultats qualitativament molt similars, per a l'avaluació de la distància entre filaments s'ha seleccionat el mètode de viabilitat cel·lular (**Figura 14**) perquè és més precís.

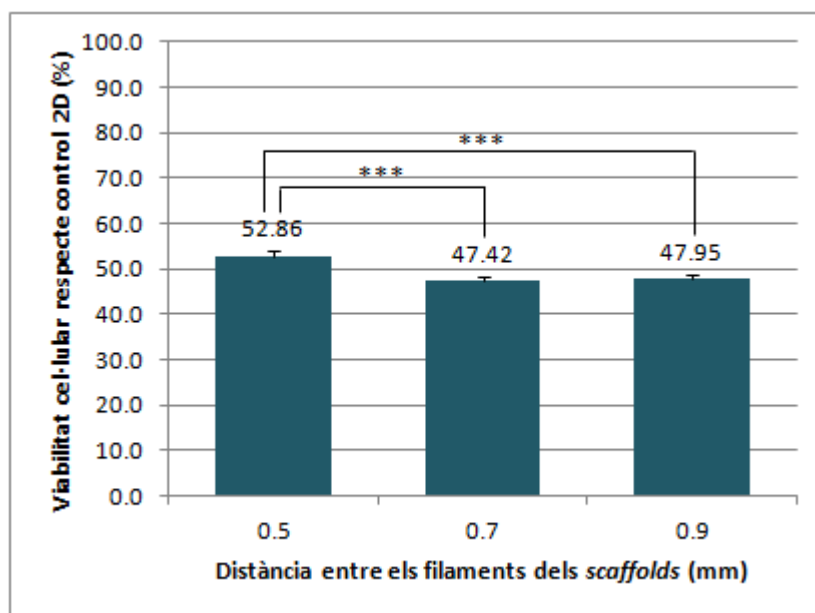


Figura 14. Percentatge de viabilitat cel·lular del cultiu tridimensional en *scaffolds* amb diferents distàncies entre filaments (0.5, 0.7 i 0.9 mm) respecte el control adherent en dues dimensions. Es representen els nivells de significació estadística amb *** ($p < 0.001$).

Els *scaffolds* amb menor distància entre filaments són els que presenten una major viabilitat cel·lular respecte el control en dues dimensions. D'altra banda, entre els *scaffolds* amb distància entre filaments de 0.7 i 0.9 mm no s'observen diferències estadísticament significatives en el nombre de cèl·lules adherides.

Aquests resultats indiquen que la distància entre filaments més favorable per al cultiu tridimensional de la línia NIH/3T3 és la de 0.5 mm, que correspon a la distància més petita que es pot imprimir en les condicions d'aquest estudi evitant la unió dels filaments.

Per tant, en aquest cas, s'observa una major viabilitat cel·lular en els *scaffolds* que presenten els porus més petits. Això es deu al fet que la quantitat de PCL és major, de manera que les cèl·lules disposen de més superfície a la qual adherir-se.

Una manera de continuar aquest experiment seria incubar els *scaffolds* durant més dies, per tal d'avaluar la proliferació cel·lular en els diferents dissenys.

Un altre possible experiment addicional seria realitzar l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT transcorregudes les 3 hores d'incubació, posterior a la sembra, per facilitar l'adhesió cel·lular. D'aquesta manera s'avaluaria l'adhesió cel·lular en els diferents dissenys.

5. CONCLUSIONS

- ❖ NIH/3T3 cells have attached with a clear tendency to filaments of the three scaffolds designed with different deposition angles. Scaffolds of 90° have shown the largest cell viability, followed by 60° and, finally, by 45° ones. Therefore, scaffolds with the biggest pore size have been the most suitable for three-dimensional fibroblast culture.
- ❖ Scaffolds designed with different distances between filaments have also been tested. The highest number of attached cells has been observed in those with a distance of 0.5 mm. No significant differences have been detected between 0.7 and 0.9 mm scaffolds. Accordingly, in this case, scaffolds with the smallest pore size have been the most suitable. This is due to the fact that 0.5 mm scaffolds have larger amount of PCL and therefore, cells have a larger surface area to adhere.
- ❖ The analysis of the three-dimensional culture in different PCL scaffolds' designs confirms the ease of fibroblasts to grow under any condition.
- ❖ Three-dimensional fibroblast culture with PCL scaffolds could be useful to generate constructs that by tissue engineering would close the drilled hole in the clivus, which serves as a door in neurosurgery.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Icahn School of Medicine at Mount Sinai, "Skull Base Surgery Center: About Skull Base Tumors" *Mount Sinai Hospital*, 2016. Recuperat el 20 d'abril de 2016, des de: <http://www.mountsinai.org/patient-care/service-areas/ent/areas-of-care/skull-base-surgery/tumors>.
- [2] N. Sarbu, L. Oleaga, J. Berenguer, T. Pujol, and M. Squarcia, "Anatomy and pathology of the skull base, CT and MRI imaging" in *Electronic Presentation Online System*, 2013.
- [3] "Skull Base Surgery" *Johns Hopkins Medicine*. Recuperat el 21 d'abril de 2016, des de: http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/test_procedures/neurological/skull_base_surgery_135,43/.
- [4] T. C. Hankinson, J. N. Bruce, and L. Robinson, "Skull Base Tumors" *Medscape*, 2015. Recuperat el 26 d'abril de 2016, des de: <http://emedicine.medscape.com/article/250237-overview#>.
- [5] E. S. Morales Deza, E. Santamarta, A. Saiz Ayala, E. Murias, P. Vega Valdes, and J. L. Llorente Pendas, "The clivus lesions: crossroads of skull base" in *Electronic Presentation Online System*, 2014.
- [6] Columbia University Department of Neurological Surgery, "Clival tumors" *Columbia University Medical Center*, 2016. Recuperat el 5 de maig de 2016, des de: <http://www.columbianeurosurgery.org/conditions/clival-tumors/>.
- [7] C. Estrada, A. C. Paz, and L. E. López, "Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas" *Escuela de Ingeniería de Antioquia*, vol. 5, pp. 93–100, 2006.
- [8] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering" *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, pp. 589–601, 2006.
- [9] P. Bartolo, M. Domingos, A. Gloria, and J. Ciurana, "BioCell Printing: Integrated automated assembly system for tissue engineering constructs" *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, vol. 60, no. 1, pp. 271–274, 2011.
- [10] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, "Poly(lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications" in *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Prof. Dhanjoo N. Ghista, Ed. InTech, pp. 247–282, 2012.
- [11] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering" *Materials Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [12] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "Fibroblasts and their transformations: the connective-tissue cell family" in *Molecular biology of the cell*, 4th ed., New York: Garland Science, 2002.
- [13] A. Giró-Perafita, M. Rabionet, T. Puig, and J. Ciurana, "Optimization of Poli(ϵ -caprolactone) scaffolds suitable for 3D cancer cell culture" *Procedia CIRP*, 2015.
- [14] J. De Ciurana, L. Serenó, and È. Vallès, "Selecting process parameters in RepRap additive manufacturing system for PLA scaffolds manufacture" *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 152–157, 2013.

- [15] T. Patrício, M. Domingos, A. Gloria, and P. Bártolo, "Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering" *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 110–114, 2013.
- [16] M. Domingos, F. Intranuovo, T. Russo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, J. Ciurana, and P. Bartolo, "The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(ϵ -caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability" *Biofabrication*, vol. 5, no. 4, pp. 1–13, 2013.
- [17] M. Chen, P. K. Patra, S. B. Warner, and S. Bhowmick, "Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on Electrospun Polycaprolactone scaffolds" *Tissue Engineering*, vol. 13, no. 3, pp. 579–587, 2007.
- [18] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique" *Biotechnology Advances*, vol. 28, pp. 325–347, 2010.
- [19] S. Palomeras, M. Rabionet, I. Ferrer, A. Sarrats, M. L. Garcia-Romeu, T. Puig, and J. Ciurana, "Breast cancer stem cell culture and enrichment using Poly(ϵ -caprolactone) scaffolds" *Molecules*, vol. 21, no. 4, pp. 537–550, 2016.
- [20] M. S. Lopes, A. L. Jardini, and R. M. Filho, "Synthesis and characterizations of Poly (lactic acid) by ring-opening polymerization for biomedical applications" *Chemical Engineering Transactions*, vol. 38, pp. 331–336, 2014.
- [21] M. Rabionet Diaz, "Disseny i fabricació de scaffolds de PCL pel cultiu i expansió en 3D de cèl·lules mare tumorals" (Treball Final de Grau) Universitat de Girona, 2015.
- [22] J. A. Ryan, "Evolution of cell culture surfaces" *BioFiles*, vol. 3, no. 8, pp. 21–24, 2008.