


Universitat de Girona
Escola Politècnica Superior

Treball final de grau

Estudi: Grau en Enginyeria Biomèdica

Títol:

Fabricació de *scaffolds* pel cultiu cel·lular de
cèl·lules canceroses per la formació de *tumoroids*.

Document: Memòria

Alumne: Gerard Cornellà i Llorens

Tutor: Maria Teresa Puig Miquel

Departament: Ciències Mèdiques

Àrea: Fisiologia

Convocatòria (mes/any): Setembre 2022

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	3
2. ESTUDI PREVI.....	4
2.1 CÀNCER.....	4
2.1.1 <i>TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER</i>	4
2.2 CULTIU CEL·LULAR.....	5
2.2.1 CULTIU EN 2D	5
2.2.2 CULTIU EN 3D	6
2.2.3 <i>TUMOROIDS</i>	7
2.3 <i>ELECTROSPINNING</i>	8
2.3.1 PARÀMETRES DE SOLUCIÓ	9
2.3.2 PARÀMETRES DE PROCÉS.....	9
2.3.3 PARÀMETRES D'AMBIENT	10
2.4 <i>BEADS</i>	10
2.5 <i>SCAFFOLDS</i>	11
2.6 MATERIALS	12
2.6.1 PCL.....	12
2.6.2 PLA.....	12
2.6.3 PLGA	12
2.6.4 PEG	13
2.6.5 ETHANOL	13
2.6.7 DICLOROMETÀ	13
2.6.8 CLOROFORM	13
3. ESTAT DE L'ART.....	14
3.1 COST DEL DESENVOLUPAMENT DE NOUS FÀRMACS.....	14
3.2 <i>ELECTROSPINNING</i>	15
3.2.1 MIDA DE PORUS	15
3.2.3 COMBINACIONS DE MATERIALS.....	16
3.2.4 ALTRES MUNTATGES <i>D'ELECTROSPINNING</i>	18
4. HIPOTESIS I OBJECTIUS.....	19
4.1 PREGUNTA DE RECERCA.....	19
4.2 HIPOTESIS.....	19
4.3 OBJECTIUS	19
4.3.1 OBJECTIU PRINCIPAL	19
4.3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS.....	19
5. MATERIALS AND METÒDES.....	20

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

5.1 MÈTODES DE FOCALITZACIÓ	20
5.1.1 SUPORT DE BASE	20
5.1.2 CERCLE DE COURE	21
5.2 <i>SCANNING ELECTRON MICROSCOPE</i>	21
5.3 <i>CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE</i>	22
5.4 <i>IMAGEJ</i>	22
5.5 FACTOR D'ELONGACIÓ	22
5.6 FABRICACIÓ <i>SCAFFOLDS</i> PCL	22
5.7 FABRICACIÓ <i>SCAFFOLDS</i> mPEG-PLA-PLGA	24
5.8 <i>CULTIU CELULAR</i>	25
5.8.1 DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES	25
5.8.2 PASSE CEL·LULAR	26
5.8.3 SEMBRA	27
5.8.4 TINCIÓ	28
6. RESULTATS	30
6.1 <i>SCREENING</i> DE <i>SCAFFOLDS</i> DE PCL	30
6.2 <i>SCREENING</i> DE <i>SCAFFOLDS</i> DE mPEG-PLA-PLA	31
6.3 ESTUDI DE LES CÈL·LULES EN EL <i>CONFOCAL</i>	34
7. DISCUSSIÓ	38
7.2 LIMITACIONS	38
7.3 CONTRIBUCIONS ALS OBJECTIUS DE DESENVOLUPAMENT SOSTENIBLE (ODS) DE LES NACIONS UNIDES	38
8. CONCLUSIONS	40
8.1 <i>FUTURE WORK</i>	40
9. BIBLIOGRAFIA	41
ANNEX A PLANIFICACIÓ	46

1. INTRODUCCIÓ

El càncer és la principal causa de malaltia i de mort en la població mundial. El càncer amb més incidència entre les dones és el de mama, entre els diversos tipus de càncer de mama que hi ha, sobresalta el triple negatiu per la seva agressivitat i mal pronòstic. Una de les principals línies d'investigació es del grup de recerca de TargetsLab de la Universitat de Girona és el càncer de mama triple negatiu ja que no existeixen dianes terapèutiques i només es pot tractar amb quimioteràpia, de manera que la necessitat de trobar noves estratègies s'ha intensificat.

A dia d'avui, el nombre de fàrmacs que aconseguen ser desenvolupats, testejats en assajos clínics i que són aprovats és un percentatge molt reduït. El procediment que segueixen per ser aprovats consisteix en realitzar proves preclíniques, amb cultius en 2D i en models animals *in vivo*. Finalment, els fàrmacs més prometedors són provats en assajos clínics. El motiu pel qual el percentatge d'èxit és tant baix és que els cultius en 2D repliquen unes condicions totalment irrealistes que les cèl·lules no es trobaran dintre el cos humà. En canvi els cultius en 3D són molt més adients pel desenvolupament de fàrmacs contra el càncer, ja que permeten replicar unes condicions molt més similars que les cèl·lules trobaran dintre el cos humà. Gràcies als cultius en 3D es poden formar *tumoroids*, cèl·lules específiques d'un tumor cultivades en un cultiu en 3D capaces de replicar les característiques del tumor en qüestió i que permet obtenir respostes precises sobre la farmacocinètica i l'eficàcia toxicològica dels fàrmacs.

Entre els diversos tipus de cultiu en 3D que hi ha, sobresalta els *scaffolds*. Són unes estructures en 3D formades per un entramat de fibres de l'ordre de nanòmetres que permeten el cultiu cel·lular en 3D. L'*scaffold* ideal ha de permetre l'adhesió, proliferació, migració, invasió cel·lular, permetre la difusió de nutrients cel·lulars vitals, productes expressats, exercir certes influències mecàniques, biològiques per alterar el comportament de la fase cel·lular per tal de permetre la formació de *tumoroids*.

Existeixen diversos mètodes per fabricar *scaffolds*, però l'*electrospinning* és la tècnica ideal ja que permet fabricar *scaffolds* amb fibres de l'ordre de nanòmetres. L'*electrospinning* és una tècnica que consisteix en la dissolució d'un polímer en un solvent volàtil, expulsar aquesta solució a través d'una agulla, al mateix temps que apliquem un voltatge de kilovolts per evaporar el solvent i formar fibres a partir del polímer que s'aniran dipositant sobre un plat col·lector. En l'*electrospinning* hi entren en joc molts de paràmetres tant de procés, ambient i com de la dissolució. És necessari combinar tots aquests paràmetres per obtenir *scaffolds* lliures d'imperficcions, com ara *beads* i que permetin la proliferació de les cèl·lules canceroses en les seves fibres per formar *tumoroids*.

L'objectiu final des de TargetsLab és aconseguir *scaffolds* que permetin el cultiu cel·lular de cèl·lules canceroses que formin *tumoroids* per poder desenvolupar noves teràpies contra el càncer de mama triple negatiu. El propòsit d'aquest TFG serà fer un *screening* amb diversos materials, en diferents concentracions, per tal de fabricar diferents *scaffolds* mitjançant *electrospinning* per determinar quins *scaffolds* afavoreixen la presència de *tumoroids* per en un futur fer una recerca més exhaustiva amb sobre aquests materials.

2. ESTUDI PREVI

2.1 CÀNCER

El càncer en el seu conjunt és la principal causa de malaltia i de mort en la població en general. S'estima que el risc de desenvolupar càncer al llarg de la vida d'una persona és d'un 57,3% pels homes i d'un 37,3% en les dones. Això representa un risc de desenvolupar càncer d'aproximadament 1 tumor per cada 2 homes i 1 per cada 3 dones. Durant l'any 2020 els càncers més comuns van ser:

- de mama (2.26 milions de casos).
- de pulmó (2.21 milions de casos).
- colorectal (1.93 milions de casos).
- de pròstata (1.41 milions de casos)
- de pell (diferent a melanoma) (1.20 milions de casos).

Els tipus de càncer amb més morts van ser:

- de pulmó (1.8 milions de morts).
- colorectal (935.000 de morts).
- de fetge (830.000 de morts).
- d'estómac (769.000 de morts).
- de mama (685.000 de morts) [1].

Les dues principals causes de mortalitat a la província de Girona durant l'any 2017 van ser les malalties l'aparell circulatori i els tumors. Entre els homes, els tumors ocupen la primera causa de mortalitat, mentre que per les dones representen la segona causa després de les malalties cardiovasculars [2].

El càncer és un conjunt de malalties que es poden originar en quasi qualsevol òrgan o teixit del cos humà en què les cèl·lules anormals creixen de forma descontrolada. Les cèl·lules creixen de forma descontrolada degut a una sèrie de factors que alteren el procés de divisió cel·lular. El creixement descontrolat pot formar tumors benignes o tumors malignes, és a dir, càncer. Diem que són tumors malignes quan sobrepassen els seus límits habituals i envaeixen parts adjacents del cos i/o es propaguen a altres òrgans, aquest procés és anomenat metàstasi [3,4].

2.1.1 *TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER*

El càncer de mama és un tipus de càncer que es desenvolupa en el teixit mamari, tan pot afectar homes com dones, però és molt més freqüent en les dones. A la província de Girona durant el quadrienni 2013-2017, va ser el càncer amb més incidència entre les dones amb un 28,1% dels casos totals. Durant aquest període de temps la mitjana anual per morts de càncer de mama a la província de Girona va ser de 96 morts per any [5].

Dintre els diferents tipus de càncer de mama que hi ha, sobresalta el triple negatiu (*Triple Negative Breast Cancer TNBC*), que representa el 15% dels casos diagnosticats de càncer de mama. S'ha demostrat que aquest tipus de càncer preval més en dones premenopàusiques, és a dir, en dones adultes joves que no pas en dones postmenopàusiques. També s'ha comprovat que el TNBC es caracteritza per la seva agressivitat, mal pronòstic i per un alt risc de recaiguda.

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

Una de les principals característiques del TNBC és la falta de receptors d'estrogen, progesterona i nivells molt baixos del factor de creixement epidèrmic humà (HER2). Degut a que les cèl·lules canceroses els hi manquen els receptors típics del càncer de mama, tractaments com les teràpies hormonals, que consisteixen en limitar el creixement de les cèl·lules canceroses, queden totalment descartats. La quimioteràpia és el tractament més efectiu contra aquest tipus de càncer, tot i el seu efecte tòxic sobre la resta de cèl·lules sanes del cos humà. S'ha demostrat que els pacients de TNBC són els que tenen un pitjor pronòstic quan presenten una recaiguda entre els diferents tipus de càncer de mama. Quan hi ha una recaiguda les noves cèl·lules canceroses són resistents als agents quimioterapèutics utilitzats en el seu tractament, la quimioteràpia deixa de ser efectiva i els pacients es queden sense cap alternativa terapèutica [6,7,8].

En definitiva, encara es necessita molta de recerca i una millor comprensió de la tumorigènesis i la progressió tumoral del TNBC, que permetrà dissenyar nous i millors tractaments individualitzats pels pacients de càncer de mama triple negatiu.

2.2 CULTIU CEL·LULAR

El cultiu cel·lular són tots aquells procediments que es realitzen dintre un laboratori per permetre el creixement tant cèl·lules eucariotes com procariotes a unes determinades condicions fisiològiques, típicament a 37°C i amb un controlador humidificat de gas que conté una barreja de 95% O₂ i 5% CO₂ [9].

A principis del segle XX, Harrison va dur a terme el primer cultiu cel·lular estudiant l'origen de les fibres nervioses. Fins a dia d'avui, el cultiu cel·lular ha anat millorant fins a convertir-se en una eina fonamental per entendre el creixement i la diferenciació cel·lular fora del cos humà. Les aplicacions del cultiu cel·lular són diverses, però en el context clínic s'utilitzen per crear models per estudiar la biologia cel·lular bàsica, la morfologia de teixits, reproduir mecanismes de certes malalties, investigar la toxicitat de nous fàrmacs i en la síntesi de proteïnes. A més a més, la homogeneïtat de les poblacions cel·lulars clons o dels tipus cel·lulars específics i els sistemes de cultiu ben definits eliminen les variables genètiques o ambientals de confusió, generant dades amb una alta reproductibilitat i consistència que no es poden obtenir quan s'estudien sistemes d'òrgans complets. Una altra de les grans avantatges dels cultius cel·lulars permet substituir els models animals. Menys del 8% dels fàrmacs provats en models animals, han tingut resultats positius en assajos clínics en humans, això és degut a que els models animals entren en joc molts factors incontrolables, com l'homeòstasi o la regulació hormonal. També el cost de mantenir els models animals és molt més elevat que no pas en un cultiu. En els estudis de recerca del càncer en la fase preclínica, el cultiu cel·lular permet entendre millor la biologia del tumor, testejar nous fàrmacs, optimitzar els tractaments de radioteràpia i de quimioteràpia [10,11,12].

Els cultius es poden realitzar en certes condicions d'adherència, on les cèl·lules estan adherides en una placa de Petri o vegades es troben en suspensió, que en alguns casos reproduïxen molt millor les condicions en que es troben les cèl·lules dintre el cos humà. El cultiu cel·lular més utilitzat és el 2D però té certes limitacions i el que està guanyant popularitat és el cultiu en 3D, que reproduïx molt millor les condicions en que es troben les cèl·lules dintre el cos humà.

2.2.1 CULTIU EN 2D

El cultiu cel·lular en 2D, les cèl·lules creixen adherides en una superfície com per exemple en una placa de Petri. Les principals avantatges d'aquest tipus de cultiu és que són molt simples i comporten un cost econòmic molt baix. Per altra banda, els cultius en 2D disminueixen o

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

eliminen les característiques fisiopatològiques dels tumors. Com es pot veure, en la figura 1 les cèl·lules en 2D tenen una morfologia aplanada i allargada i s'expandeixen al llarg del pla de cultiu, però no s'expandeixen en el pla vertical. En condicions *in vivo*, les cèl·lules tumorals s'expandeixen en diverses orientacions que fa que tinguin moltes més interaccions amb la resta de cèl·lules dintre el cultiu. Aquestes interaccions són les responsables de la diferenciació cel·lular, proliferació, vitalitat, expressió de gens i proteïnes i metabolisme de fàrmacs. A més a més, les cèl·lules en cultiu en 2D tenen un accés il·limitat a l'oxigen, nutrients i factors de creixement, que representen unes condicions irreal. Quan es fan proves de nous fàrmacs en cultius en 2D aquests ràpidament es difonen pel cultiu i uniformement, això representa una resposta totalment irreal en condicions *in vivo* [12,13].

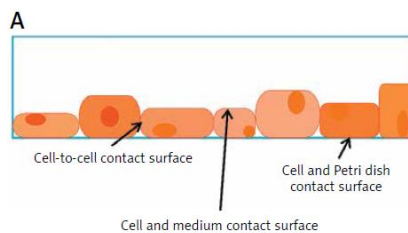


Figura 1. Morfologia de les cèl·lules en el cultiu en 2D [12].

2.2.2 CULTIU EN 3D

El cultiu cel·lular en 3D, és el cultiu ideal per estudiar el creixement de cèl·lules en un ambient fisiopatològic molt similar *in vivo*. L'objectiu principal d'aquests cultius és reconstruir la matriu extracel·lular (ECM) i reproduir el microambient tumoral. (TME) [14].

La matriu extracel·lular és un suport físic acel·lular, compost per proteïnes en forma de fibres, com el col·lagen, macromolècules estructurals i molècules adhesives. L'ECM és essencial per una gran quantitat de processos cel·lulars per mantenir la morfogènesis, la homeòstasi, la integritat i la elasticitat dels teixits. Quan hi ha metastasi, es veuen canvis significatius en l'ECM que pateix canvis significatius en la seva arquitectura. Quan les cèl·lules tumorals proliferen hi ha un increment en la secreció de proteïnes de la matriu com ara la fibronectina i el col·lagen I, III i IV que ens indiquen la progressió del tumor. A més a més, la matriu extracel·lular és una gran font de reserva de factors de creixement i precursors metabòlics [15,16].

En aquest tipus de cultiu les cèl·lules, s'expandeixen tant en el pla horitzontal com en pla vertical, la qual cosa permet conservar les seves interaccions com passa *in vivo*, tal i com podem veure en la figura 2 [12].

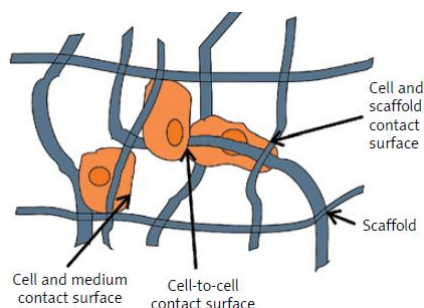


Figura 2. Morfologia de les cèl·lules en el cultiu en 3D en un scaffold [12].

La morfologia de les cèl·lules en cultius 3D en *scaffolds* és arrodonida, ja que d'aquesta manera els hi facilita interaccionar amb la resta de les cèl·lules. Una altra de les avantatges de poder reproduir la morfologia de les cèl·lules *in vivo*, és mantenir la polaritat de les cèl·lules que a la

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

vegada bloquegen la apoptosi característic del càncer, un tipus de mort cel·lular programada en què el cos humà utilitza per desfer-se de les cèl·lules innecessàries o anormals [17]. *In vivo*, l'estructura tridimensional de les diferents cèl·lules creen gradients fisiològics que dificulten la difusió de substàncies de manera que la difusió de nutrients i oxigen és molt més variable en 3D, també es més difícil que els fàrmacs a testejar es difonguin uniformement per totes les cèl·lules i ens dona una resposta molt més precisa de l'eficàcia dels nous fàrmacs. S'ha demostrat que els cultius cel·lulars en 3D repliquen molt millor el comportament de les cèl·lules canceroses en el seu estat natural *in vivo* [12].

Dintre el cultiu en 3D hi ha diferents opcions:

- *Spheroids*: són cultius en suspensió, en que es cultiven agregats de cèl·lules. És el tipus de cultiu en mes comú degut a la seva senzillesa i baix cost [12].
- *Hidrogels*: són unes xarxes compostes per polímers hidròfils, que exhibeixen una estructura que pot imitar la naturalesa de l'ECM [12].
- *Scaffolds*: són estructures sintètiques en 3D, formades per un conjunt de fibres que imiten la funció de l'ECM [12].

2.2.3 TUMOROIDS

Els *tumoroids* es poden definir com a *tumor organoids*, un tipus de cultiu en 3D que conté cèl·lules específiques d'un tumor i replica les característiques del tumor en qüestió. Aquests tipus de cultius proporcionen molta informació sobre el creixement, la diferenciació i l'estructura cel·lular del tumor. La gran pregunta que es feia la comunitat científica era si aquest tipus de cultiu en 3D, era realment una tècnica rellevant i si era possible traslladar els resultats de la preclínica a la clínica i ja s'ha compravat que a dia d'avui els *tumoroids* són una eina que funciona, molt prometedora com a models preclínic de càncer per millorar el desenvolupament de nous fàrmacs [18].

K. Ganesh *et.al* va cultivar *tumoroids* a partir de cèl·lules de càncer rectal. Aquest tipus de càncer és el segon més mortífer i el tractament actual consta tant de cirurgia, quimioteràpia com radioteràpia. Es van testejar diferents tractaments tant de quimioteràpia com radioteràpia en els *tumoroids*, *ex vivo*, i en en el tumor, *in vivo*, per avaluar quina era la resposta en els dos casos. Es va comprovar que la resposta en els dos models era similar indicant que els *tumoroids* és una bona eina per poder avaluar tractaments. Al final de l'article presenten aquest tipus de cultiu en 3D com una alternativa als models animals, també com un possible banc de proves quan el tractament estàndard pel càncer rectal no té l'efecte desitjat i s'hagin de buscar noves estratègies per atacar aquest tipus de càncer [19].

Les cèl·lules tumorals quan són sembrades en el cultiu en 3D i formen els *tumoroids*, s'assemblen a tumors micrometastàtics. A mesura que es van formant els *tumoroids*, es produeix un fenomen anomenat *epithelial mesenchymal transition* (EMT), un conjunt de processos molt complexos realitzats a l'ECM que ens indiquen que el càncer evoluciona cap a la metastasi, que les cèl·lules tenen capacitat migratòria i invasiva. Una de les característiques més rellevants quan es produeix l'EMT és la resistència de les cèl·lules tumorals als fàrmacs. A nivell molecular l'EMT, ve associada amb la pèrdua de la molècula d'adhesió cel·lular *E-cadherina* una glicoproteïna transmembrana que depèn del calci, responsable de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula [20].

En definitiva, els *tumoroids* són una molt bona eina per avançar en la medicina personalitzada. Aquesta tècnica ens permet cultivar cèl·lules canceroses del propi pacient a partir d'un biòpsia, ja que sabem que el *tumoroid* tindrà una gran semblança amb el tumor *in vivo*, el que ens permetrà testejar nous fàrmacs sense la necessitat d'experimentar amb el pacient.

2.3 ELECTROSPINNING

L'*electrospinning* és una de les tècniques més comunes per tal de produir fibres de l'ordre de nanòmetres. És una tecnologia que va ser patentada per Cooley a principis del segle XX, però no va ser fins la dècada dels 90 que la comunitat científica es va adonar del potencial d'aquesta tècnica que té unes característiques úniques: una àrea superficial molt gran respecte al volum, flexibilitat en la superfície, alta porositat, gran varietat de materials *electrospinnables*, cost econòmic baix, etc. Les fibres obtingudes mitjançant l'*electrospinning* tenen gran varietat d'aplicacions: membranes de filtració, implants dentals, sistemes d'alliberació de fàrmacs i entre d'altres cultiu cel·lular en 3D [21, 22].

En la figura 3 veiem el muntatge típic de la tècnica de l'*electrospinning*. Consta d'un capil·lar que va connectat des d'una bomba infusori fins a una agulla a través de la qual serà expulsada la solució polimèrica. Quan la solució sigui expulsada per l'agulla amb una font d'alt voltatge s'aplica un voltatge entre 1kV i 30 kV. Per aplicar el voltatge és necessari dos elèctrodes, un dels quals es col·loca en l'agulla i l'altre anirà connectat al terra i al plat col·lector, una làmina de metall conductor a on s'aniran dipositant les fibres després de l'evaporació del dissolvent [23, 24].

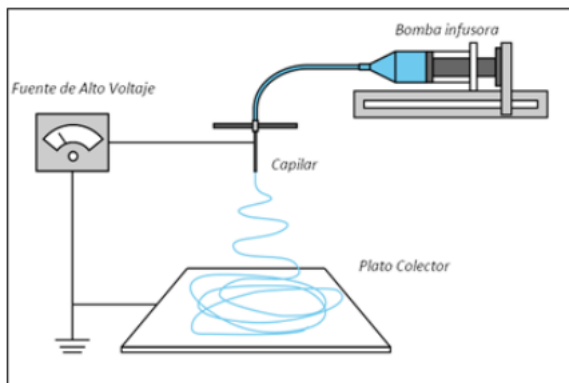


Figura 3. Muntatge típic d'*electrospinning* [23].

Per dur a terme el procés d'*electrospinning* s'ha dissolt el polímer, en un dissolvent volàtil. Un cop s'obté la dissolució s'avoça a la bomba infusori que conduirà la solució fins a l'agulla, on a la seva punta s'inicia l'aplicació d'alt voltatge. Quan aquest potencial elèctric s'aplica, les càrregues s'acumulen promovent la formació d'una gota en la punta de l'agulla, que a mesura que la intensitat del camp elèctric s'incrementa, la gota s'allarga per a crear una forma cònica coneguda com a con de Taylor. Quan la força del camp elèctric supera les forces de cohesió de la solució, en la majoria de casos dominada per la tensió superficial, es forma un doll de la solució del polímer que inicia un viatge des de la punta de l'agulla fins al plat col·lector. En el seu viatge, el doll de la solució polimèrica és allargat a causa de les interaccions electrostàtiques entre les càrregues pròximes a segments del mateix doll, mentre tant, el dissolvent s'evapora i les fibres se solidifiquen a la seva arribada al col·lector. Finalment, s'obté un entramat de fibres en orientació aleatòria anomenat *scaffold*. S'ha de dir que existeixen diferents tipus de col·lectors que també permeten l'obtenció de fibres alineades [23, 24].

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

L'*electrospinning* és una tècnica en què hi ha una gran quantitat de paràmetres involucrats, dividits en tres grans grups: paràmetres de la solució, paràmetres de procés i paràmetres ambientals, que es poden veure classificats en la taula 1.

Solution parameters	Process parameters	Environmental conditions
Concentration	Electrostatic potential	Temperature
Viscosity	Electric field strength	Humidity
Surface tension	Electrostatic field shape	Local atmosphere flow
Conductivity	Working distance	Atmospheric composition
Dielectric constant	Feed rate	Pressure
Solvent volatility	Orifice diameter	

Taula 1. Classificació dels diferents paràmetres d'*electrospinning* [21].

2.3.1 PARÀMETRES DE SOLUCIÓ

- **Concentració de la solució:** és una paràmetre directament proporcional a la mida de les fibres. A més a més, afecta directament a la viscositat i tensió superficial, a major concentració major viscositat i major tensió superficial tindrà la solució.
- **Viscositat:** a major concentració hi haurà una major viscositat degut a l'entramat de les cadenes polimèriques, si les cadenes són menys embullades, la solució tindrà una viscositat més baixa i menor concentració.
- **Tensió superficial:** és l'energia necessària augmentar la superfície per unitat d'àrea. A major concentració de la solució provoca una elevada tensió superficial que pot afavorir la presència de *beads*, degut a que les fibres no s'han pogut formar adequadament durant en el seu trajecte fins al plat col·lector.
- **Conductivitat de la dissolució:** les solucions amb una major conductivitat tindran una major força elèctrica que proporciona un estirament del doll de la solució polimèrica que resulta en fibres més primes. En canvi, una solució en menor conductivitat proporciona unes fibres més gruixudes i no uniformes degut a la falta de força elèctrica.
- **Efecte dielèctric del solvent:** una solució amb bones propietats dielèctriques tindrà una major força elèctrica i afavoreix a reduir la presència de *beads*, .
- **Volatilitat del solvent:** un solvent amb molt poca volatilitat formarà unes fibres humides ja que el solvent no s'evaporarà tant ràpid com les fibres es formen. D'altra banda, un solvent amb alta volatilitat si és massa alta les fibres no es formaran perquè el solvent s'evaporarà més ràpid que les fibres es formin [21,22, 23].

2.3.2 PARÀMETRES DE PROCÉS

- **Voltatge:** és un dels paràmetres més importants del procés d'*electrospinning*. Quan més voltatge és aplicat s'obtenen unes fibres més primes, ja que la força elèctrica produeix que des de l'agulla es formin dolls més allargats [23]. D'altra banda també s'ha relacionat l'aplicació de voltatge elevat amb un augment del diàmetre de les fibres de l'*scaffold* [22]. En definitiva, no queda clar com el voltatge afecta el diàmetre de les fibres, però el que si que sabem que l'ús d'alts voltatge afavoreix la presència de *beads*.
- **Distància entre l'agulla i el col·lector:** és necessari una distància mínima entre l'agulla i el col·lector perquè les fibres tinguin el temps suficients perquè s'evapori el dissolvent. Quan major és aquesta distància la solució tindrà més temps de vol que provoca

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

l'obtenció d'unes fibres més primes. S'ha vist que treballar a distàncies massa curtes o massa elevades indueix a la presència de defectes.

- **Flux de sortida:** determina la quantitat de solució disponible per l'*electrospinning*. El flux de sortida s'ha de regular per tal de controlar que el dissolvent tingui el suficient temps per evaporar-se quan les fibres estan en el vol cap al col·lector. No obstant és necessari mantenir un flux de sortida mínim per mantenir un con de Taylor constant [21,22,23].

2.3.3 PARÀMETRES D'AMBIENT

- **Temperatura:** pot afectar la viscositat de la solució.
- **Humitat:** afecta l'evaporació del solvent i en la formació dels porus de l'acaffold, que poden promoure la transferència de proteïnes i una migració cel·lular molt més àgil [21,23].

2.4 BEADS

Durant el procés d'*electrospinning* hi intervenen una gran quantitat de paràmetres, que s'han de tenir en compte alhora de poder fabricar *scaffolds* ja que es vol que tot el material sigui *electrospinnat* correctament. Si durant el procés de l'*electrospinning* ens assegurem de mantenir el con de Taylor evitarem molts problemes que podem detectar a simple vista com la formació de fibres humides o la creació de petites gotes a la punta de l'agulla. Un dels defectes més importants a evitar durant el procés d'*electrospinning* són els *beads*, defectes que no es poden detectar a simple vista que afecten l'estructura interna dels *scaffolds*.

Els *beads* són porcions de material no filamentat que formen part de l'*scaffold* que redueixen una de les seves millors característiques, redueixen la superfície respecte volum que afecten la homogeneïtat de les fibres de l'*scaffold*. A nivell morfològic de l'*scaffold* podem identificar els *beads* com engruïments espontanis en les fibres. En la figura 4 A, podem veure l'estructura interna d'un *scaffold* sense la presència de *beads* i en la figura 4 B l'estructura interna d'una *scaffold* amb la presència de *beads*.

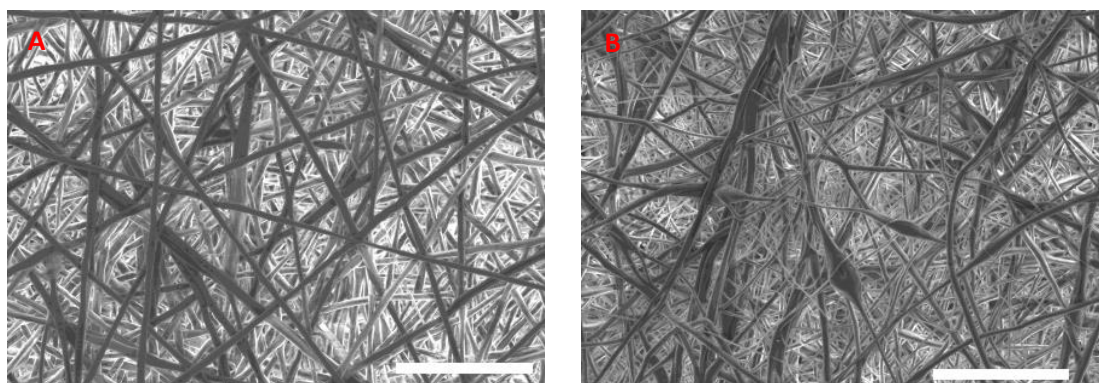


Figura 4. Scanning Electronic Microscopy (SEM) imatges **A)** Scaffold sense beads, **B)** Scaffold amb beads scaffolds (Magnification: x1000 Scale bar: 30 μ m).

És molt important evitar la presència d'aquestes estructures defectuoses dels *scaffolds* no només perquè es redueix la superfície en relació al volum sinó perquè eviten la formació de *tumoroids*. Les fibres amb *beads* són considerades de poca qualitat i normalment s'intenten optimitzar els paràmetres de l'*electrospinning* per tal d'evitar la seva formació [25].

2.5 *SCAFFOLDS*

Els *scaffolds* són estructures en 3D formades per un entramat de fibres que permeten el cultiu cel·lular. Hi ha diverses tècniques per construir aquestes bastides com ara la impressió 3D *Fused Filament Fabrication* o l'*electrospinning*. L'*electrospinning* és una tècnica molt més adient pel cultiu cel·lular en 3D, ja que ens permet crear *scaffolds* amb fibres de l'ordre de nanòmetres, molt similars als diàmetres de 20-540 nm trobats als coàguls de fibrina de l'ECM. En canvi amb la impressió 3D s'obtenen unes fibres molt grans i amb una mida de porus molt elevada que no permeten la interacció entre les cèl·lules dintre l'*scaffold* [26, 27]. Podem veure a la figura 5 la foto de diversos *scaffolds*.



Figura 5. *Scaffolds*.

La funció principal d'aquestes bastides és imitar la funció de la ECM *in vivo*. Un *scaffold* ideal ha de permetre l'adhesió, proliferació, migració, invasió cel·lular, permetre la difusió de nutrients cel·lulars vitals, productes expressats, exercir certes influències mecàniques i biològiques per alterar el comportament de la fase cel·lular. A més a més, aquestes estructures han de promoure les interaccions cel·lulars en totes les orientacions per tal de formar *tumoroïds*. Aquestes estructures fibroses tenen unes certes característiques ideals per la formació de *tumoroïds*: bones propietats mecàniques, porositat elevada, biocompatibilitat, àrea superficial molt gran respecte al volum, flexibilitat, orientacions de les fibres aleatòries, etc [12, 28].

Per la fabricació de *scaffolds* mitjançant l'*electrospinning* els materials més utilitzats són els polímers sintètics, ja que tenen una porositat elevada, són biocompatibles, no són cars, és fàcil treballar amb ells, alta reproductibilitat, etc. D'altra banda els polímers sintètics no són perfectes ja que molts d'ells presenten poca adhesió cel·lular degut a la seva hidrofobicitat. No obstant també es poden electrospinejar amb materials naturals que estan presents en l'ECM com ara el col·lagen, fibroïna i la fibronectina, ja que tenen una millor adhesió, proliferació, diferenciació i migració cel·lular respecte als materials sintètics. D'altra banda aquests materials naturals són molt més cars, delicats, tenen problemes de contaminació, de degradació i de difusió de substàncies. En l'actualitat hi ha diversos grups de recerca que han apostat pel que sembla una solució intermèdia, és la combinació d'aquests dos tipus de material, en una major concentració dels materials sintètics i menor concentració dels materials naturals per tal d'obtenir les màximes avantatges d'aquests materials [24].

Els *scaffolds* són una molt bona eina per la formació de *tumoroïds* però no són ideals. Poden tenir defectes estructurals com ara la presència de *beads* o defectes com que les fibres dels *scaffolds* siguin molt hidròfiles. Això provoca, que les cèl·lules quedin adherides a les fibres tenint una morfologia llargada com en el cas del cultiu cel·lular en 2D i no es formen *tumoroïds*. També ens podem trobar en el cas contrari que les cèl·lules no puguin adherir-se a les fibres perquè aquests són molt hidrofòbics [12, 29].

2.6 MATERIALS

2.6.1 PCL

La policaprolactona (PCL) és un polímer biodegradable, d'origen fòssil. El PCL es un polímer de la família dels polièsters alifàtics, la unitat del qual monomèrica és la ϵ -caprolactona (ϵ -CL, monòmer cíclic de fórmula química $C_6H_{10}O_2$ (figura 6)). El PCL és un plàstic biodegradable elaborat a partir de derivats del petroli. Està compost per una seqüència d'unitats de metilè, entre els quals formen un grup ester. Té un punt de fusió baix, amb la qual cosa el permet ser utilitzat com un plàstic capaç de ser modelable útil per la fabricació de prototips amb impressores 3D. A més a més, és un dels polímers sintètics més utilitzats en *electrospinning* degut a que és molt econòmic [30].

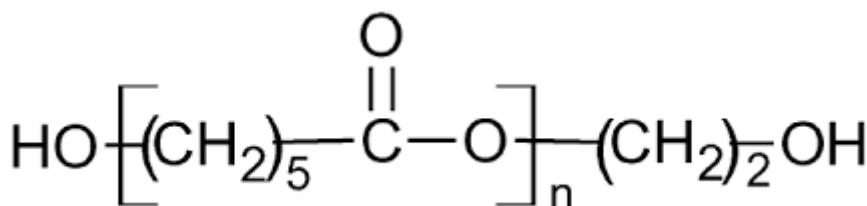


Figura 6. Estructura química del PCL [31].

2.6.2 PLA

El Poly (L-lactic acid) (PLA) (figura 7) és un termoplàstic biodegradable produït per la polimerització de l'àcid làctic, el qual ve derivat de la fermentació de certs sucres provinents de fonts de carbohidrats com la canya de sucre. PLA és una alternativa sostenible a polímers sintètics derivats del petroli com el PCL. El PLA el podem trobar en les seves dos formes en la L i la D/L. A més a més, el PLA és característic per la seva habilitat per sotmetre's a modificacions, té una molt bona degradació i bones propietats mecàniques. És un polímer amfipàtic, és a dir, és hidròfil i hidròfob a la vegada [32].

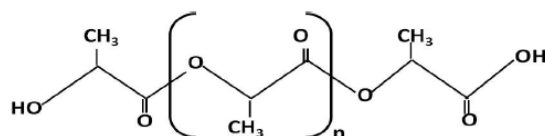


Figura 7. Estructura química del PLA [33].

2.6.3 PLGA

El Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) (figura 8) es sintetitza mitjançant una copolimerització aleatòria de *glicolide* (GA) i *lactide* (LA) [34].

El PLGA pateix degradació per hidròlisi *in vivo* per produir àcid làctic i àcid glicòlic que entra en el cicle de Krebs, s'excreta com diòxid de carboni i aigua. Una part de l'àcid glicòlic també s'excreta a través de l'orina. És un polímer hidrofòbic i que combinat amb altres polímers es poden elaborar dissolucions que poden ser *electrospinnables* [34].

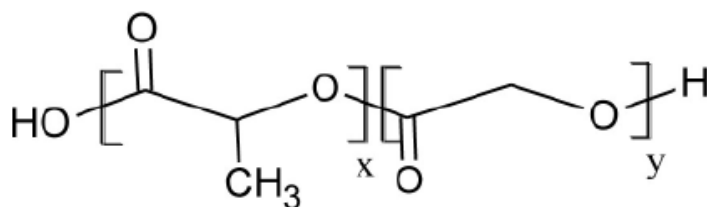


Figura 8. Estructura química del PLGA [35].

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

2.6.4 PEG

El PEG és un polímer sintètic biocompatible hidrofílic biodegradable, que també es coneix com a *poly (oxyethylene)* o *poly (ethylene oxide)* a pesos moleculars alts. L'estructura de PEG es mostra a la figura 9. PEG és sintetitzat per polimerització d'obertura d'anells aniònics d'òxid d'etilè iniciat per un atac nucleòfil d'un ió hidròxid a l'anell d'epòxid [36]. A més a més, és un material que pot ser *electrospinnable* en combinació amb altres polímers [20].

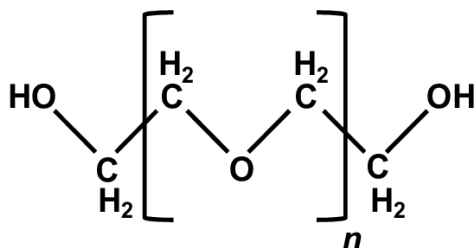
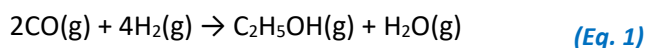


Figura 9. Estructura química del PEG [37].

2.6.5 ETHANOL

L'alcohol etílic, etanol o esperit de vi és un alcohol, de fórmula CH₃CH₂OH, que s'ha utilitzat habitualment en moltes cultures. És un líquid incolor i inflamable amb un punt d'ebullició de 78 °C. Es barreja amb aigua en qualsevol proporció i dona una barreja azeotròpica amb un contingut d'aproximadament el 96% d'etanol. Es pot obtenir a partir de l'equació 1:



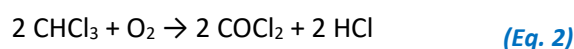
A part de les seves finalitats culinàries, l'etanol s'utilitza àmpliament en molts sectors industrials. És un bon dissolvent, pot utilitzar-se com a anticongelant i s'empra com a combustible. També actua com a dissolvent en solucions polimèriques que es preparen per fer *electrospinning* [38].

2.6.7 DICLOROMETÀ

El diclorometà (DCM)—o clorur de metilè—és un compost orgànic amb la fórmula CH₂Cl₂. És un líquid incolor volàtil amb una aroma moderadament suau i que és molt usat com solvent. Encara que no és miscible amb aigua ho és amb molts solvents orgànics. El DCM és útil en molts processos químics. S'ha fet servir en pintures i com desgreixant. També en la descafeïnació del cafè i del te i per preparar extractes de saboritzants. A més a més, actua com a dissolvent en solucions polimèriques que es preparen per fer *electrospinning* [39].

2.6.8 CLOROFORM

El cloroform (CHCl₃) (o triclorometà o triclorur de metil) és un compost orgànic de fórmula química CHCl₃. És un derivat halogenat del metà, amb el qual comparteix l'estructura tetraèdrica. Pot obtenir-se per cloració com derivat del metà o de l'alcohol etílic o, més habitualment en la indústria farmacèutica, amb ferro i àcid sobre tetraclorur de carboni. A temperatura ambient, és un líquid volàtil, no inflamable, incolor i amb una olor penetrant característica (de cítrics). Es descompon lentament per acció combinada de l'oxigen i la llum solar, transformant-se en fosgen (COCl₂) i clorur d'hidrogen (HCl) segons la següent equació 2:



Entre moltes d'aplicacions del cloroform que hi ha una d'elles es que actua com a dissolvent en solucions polimèriques que es preparen per fer *electrospinning* [40].

3. ESTAT DE L'ART

3.1 COST DEL DESENVOLUPAMENT DE NOUS FÀRMACS

A dia d'avui, el nombre de fàrmacs que aconseguen ser desenvolupats, testejats en assajos clínics i que són aprovats són poc més d'un 5%. El desenvolupament dels nous fàrmacs quimioterapèutics segueix un procediment similar que consisteix en proves preclíniques, es realitzen amb cultius cel·lulars *in vitro* i en models animals *in vivo* per determinar la farmacocinètica i l'eficàcia toxicològica dels fàrmacs. Finalment, els compostos amb millors resultats seran els que es provaran amb pacients [41].

La toxicitat i la falta d'eficàcia d'aquests nous fàrmacs són les principals causes perquè no siguin aprovats. Això es degut a que molts dels cultius cel·lulars que es realitzen per estudiar els nous compostos, es fan a través de cultius en 2D en què les cèl·lules es troben en condicions totalment irrealistes a la que es troben en el cos humà, com per exemple que tenen accés il·limitat a oxigen i a nutrients. Per altra banda s'ha comprovat que els cultius en 3D, repliquen molt millor les condicions en què es trobaran les cèl·lules dintre el cos humà[12]. Les estratègies actuals estipulen que és molt important poder replicar l'entorn del teixit per tal d'optimitzar la selecció preclínica dels compostos per ser testejats en humans.

Durant l'any 2011 a EUA més de 900 compostos contra el càncer estaven en fase de prova i només 12 van ser aprovats per la FDA. S'estima que es tarda entre 10 i 15 anys en desenvolupar un fàrmac, que pugui ser utilitzat en humans durant aquest temps centenars de fàrmacs són descartats i milions de dòlars són gastats sense cap resultat favorable. Si ens fixem la taula 2, veiem el nombre total de fàrmacs aprovats per les farmacèutiques més grans d'EUA, la seva inversió durant els anys 1997 i 2011 i el cost que ha costat desenvolupar cada nou fàrmac. Es pot observar que *NovartisAg*, és l'empresa que menys diners s'ha gastat per cada fàrmac aprovat 3.983 milions de dòlars, igualment segueix sent una quantitat molt elevada. *AstraZeneca*, ha estat l'empresa que més diners ha hagut d'invertir per cada fàrmac aprovat 11.791 milions de dòlars, una quantitat totalment desorbitada [42].

Company	No. of drugs approved	R&D spending per drug (\$millions)	Total R&D spending 1997-2011 (\$millions)
AstraZeneca	5	11,791	58,955
GlaxoSmithkline	10	8,171	81,708
Roche	11	7,804	85,841
Pfizer	14	7,727	108,178
Johnson&Johnson	15	5,886	88,285
Merck & Co. Inc	16	4,210	67,360
NovartisAG	21	3,983	83,646

Taula 2. Cost de desenvolupament de nous fàrmacs de les principals empreses dels EUA [42].

Observant les dades de la taula 2 s'ha de reivindicar la necessitat d'obtenir unes plataformes que imitin millor l'entorn fisiopatològic en què es troben les cèl·lules tumorals dintre el cos humà, per tal d'augmentar el nombre de nous fàrmacs aptes per humans i per reduir el cost de desenvolupament d'aquests nous compostos.

3.2 ELECTROSPINNING

Els *scaffolds* fabricats a partir d'*electrospinning* és un tipus de cultiu en 3D que en el desenvolupament de nous fàrmacs contra el càncer poden ser una eina fonamental ja que poden formar *tumoroids* i el seu cost de fabricació és econòmic. Per tal d'obtenir els millors *scaffolds* possibles perquè es formin *tumoroids*, es poden fer una gran quantitat de modificacions del procés i muntatge típic de l'*electrospinning*.

3.2.1 MIDA DE PORUS

Els *scaffolds* fabricats a partir de l'*electrospinning* són unes bastides que permeten el cultiu en 3D, però estan lluny de ser perfectes. Un dels problemes d'aquestes estructures són la petita mida dels seus porus. Els *scaffolds* convencionals imiten l'estructura fibrosa de l'ECM, però no la seva estructura espacial. Sovint quan en aquests *scaffolds*, les cèl·lules hi són sembrades creixent com si estiguessin en un cultiu en 2D, ja que les cèl·lules no han pogut ser sembrades en la profunditat de l'*scaffold* i per tant les cèl·lules no poden interaccionar entre elles en el pla vertical. La infiltració cel·lular és vital pels cultius en 3D i també per la formació de *tumoroids*. En l'actualitat hi ha diverses opcions per millor la infiltració cel·lular que passen per augmentar la mida dels porus de l'*scaffold* [43,44].

Combinació de nano i microfibras

Per tal d'augmentar la mida dels porus una possible solució és combinar microfibras i nanofibras. Augmentant la mida de les fibres, augmenta la porositat de l'*scaffold* i la connexivitat entre porus es veu incrementada. En la figura 10, es pot veure un esquema de com les fibres interactuen entre elles per formar aquest *scaffold*. D'aquesta manera hi haurà una millor penetració cel·lular en la sembra i augmentaran les interaccions entre cèl·lules dintre l'*scaffold* en el pla vertical. Amb aquest mètode es busca potenciar les millors qualitats de cada tipus de fibra les nano, per afavorir l'adhesió i proliferació cel·lular, i les micro per augmentar la mida dels porus afavorint la capacitat que tenen les cèl·lules per infiltrar-se dintre l'*scaffold*. Quynh P. Pham *et.al* va combinar fibres de 600 nm i 5 µm utilitzant el mateix polímer, PCL, però canviant diferents paràmetres de solució i de procés, és a dir, variant la concentració del polímer i augmentant el voltatge aplicat i es van obtenir fibres de mides diferents dintre un mateix *scaffold*. Per dur a terme aquesta tècnica, s'anaven alternen les solucions perquè fossin *electrospinnjades* per tal d'obtenir un *scaffold* amb mides diferents de fibres [45,46].

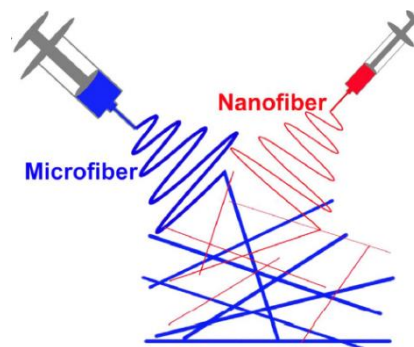


Figura 10. Combinació de microfibras i nanofibras [45].

Electrospinning amb salts

Un altre dels mètodes que hi ha per augmentar la mida dels porus sense haver de modificar la mida de les fibres i d'aquesta manera mantenir l'homogeneïtat de totes les fibres de l'*scaffold* és fer ús de salts. És un mètode molt utilitzat en *electrospinning*, per tal de garantir una bona porositat en l'*scaffold* i així assegurar una bona penetració per part de les cèl·lules en el moment de la sembra. Per dur a terme aquest procediment és necessiten micropartícules de clorur sodi NaCl, és a dir, salts d'una mida inferior a 200 μm . No hi ha una única manera d'introduir aquests salts dintre l'*scaffold*, en la figura 11 i 12, s'observa una de les opcions és que a mesura que la solució és *electrospinnada* alhora es fan passar els salts per un tamís, de tal manera que quan es formen les fibres els salts aniran precipitant i formaran part de l'estructura interna de l'*scaffold* [45, 47].

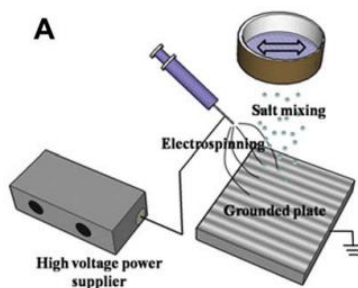


Figura 11. Introducció de micropartícules de salt a l'estructura interna de l'*scaffold* [47].

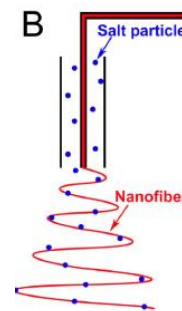


Figura 12. Introducció de micropartícules de salt a l'estructura interna de l'*scaffold* [45].

3.2.3 COMBINACIONS DE MATERIALS

Hi ha una gran varietat de materials que poden ser *electrospinnables*, des de polímers sintètics com PCL fins a materials naturals com el col·lagen que el trobem en l'ECM. En molts de processos d'*electrospinning* es prepara una combinació de diferents polímers o una combinació d'un polímer amb un material natural, per tal de limitar els desavantatges de cada material i potenciar al màxim els avantatges de cada material.

Combinació de diferents polímers

La hidrofobicitat dels materials *electrospinnables* és un dels factors més importants a per tindre una bona adhesió cel·lular. Els materials utilitzats no poden ser molt hidròfils, ja que les cèl·lules quedarien totalment enganxades en les fibres, dificultaria la seva proliferació i interaccions amb altres cèl·lules. Però tampoc pot ser un material hidrofòbic perquè dificultaria l'adhesió cel·lular de les cèl·lules a les fibres de l'*scaffold*. La poly(ϵ -caprolactone) (PCL) és un dels polímer més utilitzats per la fabricació de *scaffolds* ja que és un polímer biocompatible, però és poc hidròfil. Una de les opcions per millorar la seva hidrofobicitat dels *scaffolds* fabricats amb PCL, és la combinació amb altre polímer com ara poly(*N*-vinylpyrrolidone)-*b*-PCL (PVP-*b*-PCL), un polímer biocompatible i amfipàtic. S'ha estudiat la combinació d'aquests polímers en diferents concentracions des de PCL/PVP-*b*-PCL (100/0, w/w) fins a PCL/PVP-*b*-PCL (70/30, w/w) per veure si en combinació d'un polímer més hidròfil augmentava la viabilitat cel·lular.

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

En la figura 13, veiem com augmentant la concentració de PCL/PVP-b-PCL disminueix la seva hidrofobicitat, ja que la gota d'aigua queda més adherida a la superfície. L'*scaffold* produït amb la concentració de de PCL/PVP-b-PCL (90/10, w/w) va ser l'*scaffold* amb més viabilitat cel·lular amb un diferència notable respecte a la resta de concentracions possibles. En definitiva, es va comprovar que amb la presència de un component amifòfic que reduïa la hidrofobicitat dels *scaffolds* de PCL, però que una major presència del polímer més hidròfil no augmentava la viabilitat cel·lular dels *scaffolds* [48].

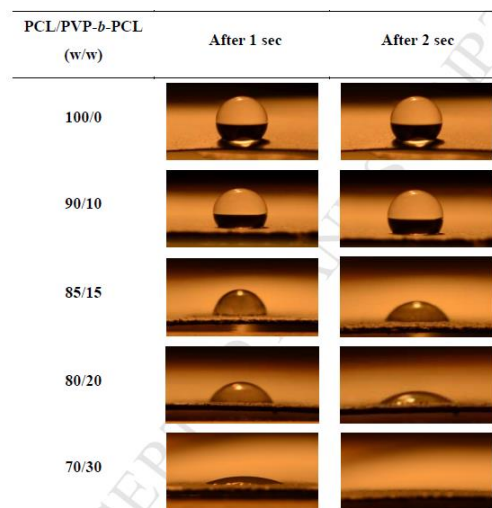


Figura 13. Mesura de la hidrofobicitat dels *scaffolds* de PCL/PVP-b-PCL [48].

Per tal d'estudiar la tumoregènesis dels melanomes, Yaping Wang *et.al* va fabricar diferents *scaffolds* amb diferents concentracions de PLA i de poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG). El PLA té una molt bona biocompatibilitat, però té dificultats per afavorir la bioactivitat i adhesió cel·lular, per aquest motiu es va combinar amb PBLG, Els resultats van demostrar que els *scaffolds* amb una millor biocompatibilitat eren aquells que contenien una combinació dels dos polímers. Amb la presència del PBLG, es va reduir la hidrofobicitat dels *scaffolds* que va passar a tenir un *water contact angle* de 79,3 en canvi els *scaffolds* amb PLA només tenien un 90,8 de *water contact angle*, demostrant que reduint la hidrofobicitat hi havia una millor biocompatibilitat, adhesió i proliferació cel·lular [49].

Combinació de materials naturals amb polímers

Per tal de millorar la biocompatibilitat dels *scaffolds* es poden combinar els polímers amb materials naturals. Quan es fan solucions barrejant aquests dos tipus de materials sempre s'ha de tenir en compte que els materials naturals aporten una millor biocompatibilitat però que a la vegada són més cars i molt més delicats que els polímers, per aquest motiu els polímers estaran en una major concentració que no pas els materials naturals.

En l'enginyeria de teixits s'estan desenvolupant tota mena de *scaffolds* que siguin capaços de regenerar més ràpidament lesions de la pell, per aquest tipus d'aplicacions es sol combinar un polímer amb un o més materials naturals. Leila Mohammadzadeh *et.al*, va fabricar diferents *scaffolds* de PCL conjuntament amb Fibroïna (SF), membrana d'ou (SESM) i gel d'aloè vera (AV) per tal de veure si amb la presència d'aquests materials naturals els *scaffolds* induïen a una regeneració més ràpida de les lesions de la pell. La fibroïna va ser escollida per la seva presència en l'ECM, la membrana d'ou perquè és una estructura molt rica en col·lagen i el gel d'aloè vera per afavorir la proliferació cel·lular. Es van fabricar tres *scaffolds* de PCL/SF, PCL/SF/SESM i PCL/SF/SESM/AV sempre el PCL com a component principal i es va veure que en els tres tipus de *scaffolds* ajudaven a regenerar la pell més ràpidament, en especial l'*scaffold* amb PCL/SF/SESM/AV tenia una proliferació cel·lular més elevada que la resta [50].

3.2.4 ALTRES MUNTATGES D'ELECTROSPINNING

Elèctrode auxiliar

Durant el procés d'*electrospinning*, la força que forma les fibres a partir de la solució és la força electroestàtica que ve donada per un alt voltatge que és aplicat. Donat que les cargues electroestàtiques es troben durant tot el doll format durant l'*electrospinning*, es pot aplicar un camp elèctric exterior per tal de controlar aquest doll. Amb petites variacions del camp elèctric es pot produir un efecte sobre on es dipositen les fibres *electrospinnades*. Per tal de manipular aquest camp elèctric i tenir un control sobre el doll de l'*electrospinning*, és necessari la presència d'un elèctrode auxiliar. En la figura 14, podem veure un muntatge d'*electrospinning* amb la presència d'un anell que actua com a elèctrode auxiliar. Aquest elèctrode va connectat a la font d'alt voltatge i situat a la punta de l'agulla per on surt el doll de la dissolució. De tal manera, entre aquest anell i el col·lector que està connectat al terra es crea un camp elèctric que farà que les fibres durant el seu viatge fins al col·lector, no sobresurtin d'aquest camp i quedin focalitzades en una regió. D'aquesta manera amb l'efecte d'aquest anell es pot concentra la zona en que es dipositaran les fibres. En la figura 15, es pot apreciar que l'anell es posa a la punta de l'agulla per tal de controlar el raig que sobresurt de l'agulla des de el principi [24].

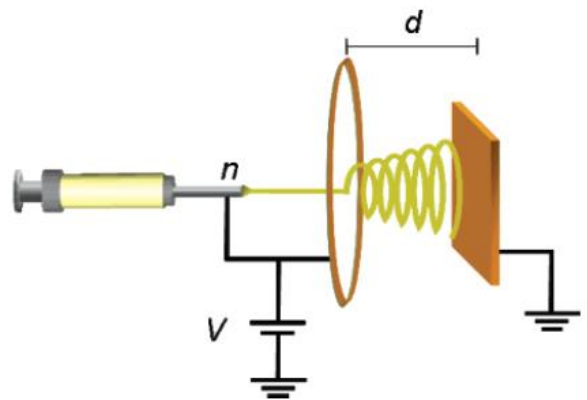


Figura 14. Muntatge d'electrospinning amb l'anell [46].

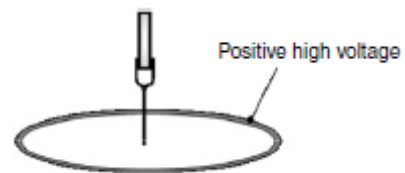


Figura 15. Elèctrode auxiliar situat a la punta de l'agulla [24].

Col·lector rotatiu

L'*electrospinning* és una tècnica que té la capacitat de crear estructures formades per fibres aleatòriament i també fibres de forma estructurades i alineades. En cultius cel·lulars pot interessar, que les cèl·lules siguin sembrades en *scaffolds* que tinguin les fibres alineades i ordenades ja que d'aquesta manera repliquen millor l'entorn en què es troben en el cos humà, com és el cas de les cèl·lules musculars [51].

El muntatge típic d'*electrospinning* hi ha un col·lector fixe que està connectat al terra i allà és on les fibres un es van dipositant de forma aleatòria per formar l'*scaffold*, però hi ha la possibilitat de canviar aquest col·lector fixe per un col·lector dinàmic en forma de cilindre, com el de la figura 16. El col·lector rotatiu també va connectat al terra igual que el col·lector fixe. S'ha demostrat que es poden obtenir *scaffolds* amb fibres alineades, utilitzant un col·lector dinàmic que és un cilindre connectat al terra [24].

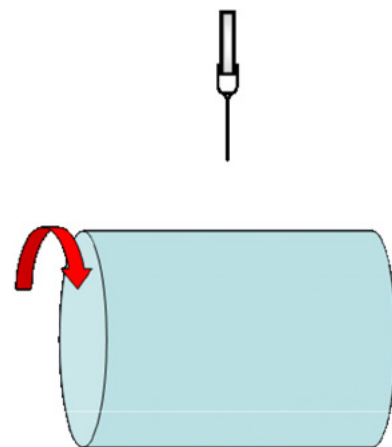


Figura 16. Col·lector rotatiu [24].

4. HIPOTESIS I OBJECTIUS

4.1 PREGUNTA DE RECERCA

És possible fabricar estructures en 3D, com són els *scaffolds* fabricats a partir d'*electrospinning* que permetin el cultiu cel·lular de cèl·lules canceroses per formar *tumoroids* fent un *screening* de materials i de diferents concentracions d'aquests materials?

4.2 HIPOTESIS

Fent un *screening* de diversos materials i de diferents concentracions d'aquests materials, serem capaços de fabricar *scaffolds* mitjançant *electrospinning* que permetran el cultiu cel·lular de cèl·lules canceroses afavorint la formació de *tumoroids*.

4.3 OBJECTIUS

4.3.1 OBJECTIU PRINCIPAL

Realitzar un banc de proves amb diversos materials, en diferents concentracions, per tal de fabricar diversos *scaffolds* mitjançant *electrospinning* per determinar quins *scaffolds* afavoreixen la presència de *tumoroids* per en un futur fer una recerca més exhaustiva amb sobre aquests materials.

4.3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS

- Fabricació de *scaffolds* lliures d'impureses superficials i de defectes interns com els *beads*.
- Fabricació de *scaffolds* reproduïbles, ben caracteritzats, utilitzant els mateixos paràmetres de procés i de mida similar.
- Ús de dues de metodologies de focalització diferents.
- Determinar si afecta en la presència de *beads* l'ús diferents materials, concentracions, paràmetres de procés i metodologies de focalització.
- Determinar la mida de les fibres dels *scaffolds* i de la mida dels seus porus dels *scaffolds* lliures de *beads*.
- Estudiar la circularitat de les cèl·lules mitjançant el factor d'elongació, en els *scaffolds* sembrats lliures de *beads*.

5. MATERIALS AND METÒDES

5.1 MÈTODES DE FOCALITZACIÓ

Durant la realització del TFG, es van provar dos mètodes de focalització amb l'objectiu de comprovar si hi havia diferències en la morfologia de les fibres depenen del mètode utilitzat. Els dos mètodes de focalització van ser seleccionats amb l'objectiu d'obtenir *scaffolds* uniformes, reproduïbles i utilitzant el menor volum de solució possible.

5.1.1 SUPORT DE BASE

El muntatge típic d'*electrospinning* com hem vist anteriorment en la figura 3 les fibres es dipositen al plat col·lector, que és una làmina de metall conductor connectada al terra. El primer mètode de focalització utilitzat, vam canviar el col·lector de la làmina de metall per un col·lector en forma circular (figura 17) de 3 cm de diàmetre per poder fabricar *scaffolds* reproduïbles del mateix diàmetre i també per gastar menys volum de solució polimèrica. El material del amb què està fet el col·lector és d'acer inoxidable tipus 316, és un acer inoxidable de crom níquel austenític que conté molibdè. L'ús d'aquest col·lector ens permetia focalitzar on es dipositaven les fibres i evitar que les fibres formades es dispersessin.

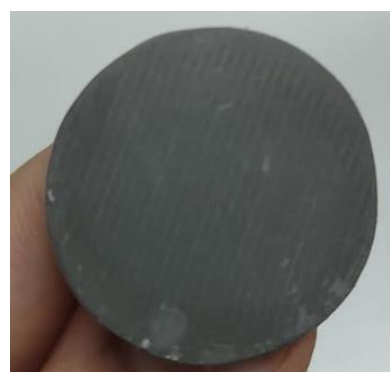


Figura 17. Col·lector circular.

La figura 18 mostra el primer muntatge que es va fer amb el nou col·lector, on tenim el nostre col·lector connectat al terra a través d'un cable i vam enganxar un tros de cinta aïllant per tal d'evitar que les fibres es dipositessin sobre el cocodril del cable. La cinta aïllant no va tindre l'efecte desitjat i les fibres es van dipositar pel col·lector, pel cocodril i pel cable. Vam haver de buscar una solució perquè les fibres es dipositessin només sobre el col·lector.



Figura 18. Primer muntatge amb el col·lector.

Des de TargetsLab, es van encarregar uns suports de base per tal d'aïllar l'efecte que provocava el cable amb que connectàvem al terra el nostre col·lector per evitar que les fibres es dipositessin a llocs no desitjats. Paral·lelament, vaig dissenyar un parell de prototips de suports de base amb el SolidWorks, que es poden veure a la figura 19 per poder continuar treballant amb l'*electrospinning*.



Figura 19. Prototips de suports de base

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

Els suports tenien un forat per tal de muntar-hi el nostre col·lector i per sota es connectava el terra a través d'un cable al col·lector, d'aquesta manera reduïem l'efecte que provocava el cable quedant per sota del col·lector i evitàvem que les fibres es dipositessin sobre llocs no desitjats. Amb els dos prototips hi va haver una millora considerable respecte al primer muntatge.

En la figura 20 es pot veure el suport final que va ser utilitzat per fabricar els *scaffolds*. Aquest suport també tenia un forat per on muntar el col·lector i poder connectar el cable del terra per sota, era un suport compacte i de més alçada que els prototips per tal d'obtenir més aïllament.



Figura 20. Suport de base.

5.1.2 CERCLE DE COURE

L'altre mètode de focalització utilitzat durant el TFG, va ser utilitzant un cercle de coure que actuaria com un elèctrode auxiliar com el cas descrit a l'estat l'art. Aquest mètode consisteix en col·locar un elèctrode, en aquest cas un cercle de coure per tal de controlar la trajectòria de les fibres i que es dipositin sobre una àrea determinada. Respecte a l'altre mètode vam treure el suport de base i vam substituir el nostre col·lector circular per una làmina de metall conductor, paper d'alumini.

En la figura 21, observem com era el nostre muntatge d'*electrospinning* en que tenim una peça de suport que subjectava el nostre cercle de coure i ens permetia col·locar-lo al més proper possible de la punta de l'agulla. A la figura 22, veiem el cercle de coure de 6 cm de diàmetre que va ser utilitzat per la fabricació de *scaffolds* que ens permetia obtenir *scaffolds* aproximadament de 3'3 cm de diàmetre.



Figura 22. Cercle de Coure.

5.2 SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Per determinar la presència de *beads* en els *scaffolds*, vam utilitzar el *Scanning Electron Microscope* (SEM). El SEM és un tipus de microscopi electrònic capaç de produir imatges d'alta resolució de la superfície d'una mostra utilitzant les interaccions electrons-matèria. L'equip genera un feix d'electrons en lloc de llum per tal de formar la imatge que reflexa les característiques superficials de la mostra [52]. Per ser visualitzades les mostres se'ls hi va aplicar un banyat de carboni i en alguns casos un banyat d'or.

5.3 CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE

Per estudiar si les cèl·lules un cop sembrades als *scaffolds* aconseguien formar *tumoroids* vam utilitzar el confocal. Un microscopi confocal és un microscopi capaç d'obtenir imatges tridimensionals d'un objecte com, per exemple, d'una cèl·lula. Es basa en un principi similar al d'un microscopi de fluorescència, però s'utilitzen dos diafragmes confocals –és a dir, que té el mateix focus–, un situat davant de la mostra i l'altre darrere; d'aquesta manera es pot dirigir la il·luminació a un únic punt de la mostra [53].

5.4 IMAGEJ

L'*imageJ* va ser el *software* amb què es va poder treballar amb les imatges obtingudes a partir del SEM i el confocal. Gràcies aquest *software* vam poder determinar el diàmetre de les fibres de l'*scaffold*, l'àrea de porus amb les imatges del SEM i la circularitat de les cèl·lules amb les imatges del confocal.

5.5 FACTOR D'ELONGACIÓ

El factor d'elongació és la mesura que farem servir per calcular la morfologia de les cèl·lules en el confocal. Podem veure la seva fórmula en l'equació 3.

$$\text{Factor d'elongació} = \frac{\text{Amplada}}{\text{Allargada}} \quad \text{Eq. 3}$$

Si el resultat d'aquest factor és proper a 1 ens indicarà que la cèl·lula té una allargada i amplada molt similars, per tant la cèl·lula tindrà una morfologia arrodonida el que podria ser indicatiu de la formació de *tumoroids*.

5.6 FABRICACIÓ *SCAFFOLDS* PCL

Prèviament a la realització del meu TFG en el grup de TargetsLab conjuntament amb el GREP van estudiar l'efecte de diversos dissolvents en una solució del 15% de PCL. Es va veure que els *scaffolds* amb una major viabilitat cel·lular eren els que s'utilitzaven el dissolvent Cloroform/Etanol (70:30, v/v). Es va plantejar la hipòtesis de que baixant la concentració de PCL, el diàmetre de les fibres disminuiria i que les cèl·lules sembrades en l'*scaffold* tindrien una major circularitat i haurien més de possibilitats de formar *tumoroids*.

D'acord amb aquest estudi es van preparar tres solucions de PCL baixant la concentració del 15%, són aquestes tres:

- 8% PCL (w,v) -> 4 g PCL es van dissoldre en 50 mL of Cloroform/Etanol (7:3, v/v).
- 10% PCL (w,v) -> 5 g PCL es van dissoldre en 50 mL of Cloroform/Etanol (7:3, v/v).
- 12% PCL (w,v) -> 6 g PCL es van dissoldre en 50 mL of Cloroform/Etanol (7:3, v/v).

Es van deixar dissoldre les tres solucions amb un agitador magnètic, una mosca, a 70 rpm a 50°C durant 24 hores.

Per les tres solucions es va utilitzar la metodologia de focalització suport de base per fabricar els *scaffolds*. Un cop es van obtenir els *scaffolds* amb aquesta metodologia es van portar al SEM per tal d'observar si podien ser aptes pel cultiu cel·lular, és a dir, miràvem si hi havia la presència de *beads*. A la taula 3, podem veure els paràmetres de procés utilitzats conjuntament amb el volum

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

gastat de solució i el gruix de l'*scaffold* mesurat per cada una de les tres solucions. El gruix de l'*scaffold* és un paràmetre molt important ja que sempreha de mesurar entre 300 i 400 micròmetres perquè hi hagi una òptima difusió de nutrients.

Solució	Voltatge (kV)	Flow Rate (mL/H)	Distància al collector (cm)	Volum gastat (mL)	Gruix Scaffold (μm)
8%	12'5	1	9,5	-	-
10%	11	1	10	0,45	300-400
12%	10,75	1	8,5	0,37	300-400

Taula 3. Paràmetres de procés, volum gastat i gruix d'*scaffold* per *scaffolds* de PCL.

Observant el volum gastat de les solucions respecte la concentració de cada solució observem una relació que a major concentració es gastava menys volum, degut a que les fibres tenien una diàmetre més gran i amb menys volum gastat tenien el gruix adequat.

A continuació vam decidir, provar una nova metodologia de focalització utilitzant el cercle de coure per determinar si influenciava la metodologia de focalització en la presència de *beads* en les fibres dels *scaffolds*. Només, es va provar el cercle de coure amb la solució de les tres que es van veure millors resultats al SEM que va ser la de 12% de PCL. Durant la fabricació dels *scaffolds* de PCL, es va comprovar que el flux de sortida, *flow rate*, ideal per les tres solucions era de 1mL/h. Tenint en compte que per la solució del 12% havíem de gastar 0'37 mL per fabricar cada *scaffold* estàvem aproximadament 22 minuts per fabricar cada *scaffold*, amb el cercle de coure vam fer una sèrie de proves per tal d'augmentar el *flow rate* per així poder fabricar més *scaffolds* amb el menor temps possible. A la taula 4, observem els paràmetres de procés utilitzats conjuntament amb el volum gastat i el gruix de l'*scaffold* emparats amb el cercle de coure.

Solució	Voltatge (kV)	Flow Rate (mL/H)	Distància al collector (cm)	Volum gastat (mL)	Gruix Scaffold (μm)
12% PCL + cercle de coure	11'3	1	9	0'49	300-400
12% + cercle de coure + augmentant <i>flow rate</i>	15	3	11	0'44	300-400

Taula 4. Paràmetres de procés, volum gastat i gruix d'*scaffold* per *scaffolds* de PCL amb cercle de coure.

Només es va poder augmentar el *rate* fins a 3 mL/h mantenint un *scaffold* resultant amb poques impureses i sense fibres humides. Una de les diferències que hi ha entre les dos metodologies és el volum gastat, amb el cercle de coure és gasta més quantitat de solució ja que l'*scaffold* resultant té un diàmetre més gran. Finalment, un cop obtinguts els *scaffolds* de PCL amb la nova

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

metodologia de focalització es van portar al SEM per observar si hi havia o no la presència de *beads*.

Durant la fabricació dels *scaffolds* de PCL es va ser molt meticulós per obtenir uns *scaffolds* amb molt poques impureses a simple vista, que fossin uniformes i evitant la deposició de fibres humides. Tot això, es va fer sempre garantint durant el procés d'*electrospinning* la formació del con Taylor per tal d'obtenir els millors *scaffolds* possibles. Per aquests cinc *scaffolds* de PCL fabricats, 8%, 10%, 12%, 12% + cercle de coure i 12%+cercle de coure+augmentant *flow rate* es van fer tres rèpliques de cada un per tal d'assegurar que fossin reproduïbles i sempre mantenint el con de Taylor durant la seva fabricació. Finalment els *scaffolds* de PCL que no tenien *beads* van ser els considerats aptes per fer-hi un cultiu cel·lular.

5.7 FABRICACIÓ SCAFFOLDS mPEG-PLA-PLGA

La següent dissolució polimèrica que vam elaborar per tal de fabricar els *scaffolds*, va ser una dissolució de mPEG-PLA-PLGA, que vam extreure de l'article de l'Yvone Girard "A Three Dimensional Scaffold for Anticancer Drug Development" [42], conjuntament amb la seva corresponent patent [54]. El mPEG-PLA-PLGA és una combinació de diferents polímers que en el seu conjunt presenten menys hidrofobicitat que no pas els *scaffolds* de PCL. El mPEG és el component hidròfil, el PLA és un component amfipàtic, és a dir, té una part hidròfoba i una part hidròfila i el PLGA és un component hidròfob.

En l'article Yvone Girard "A Three Dimensional Scaffold for Anticancer Drug Development" [42], elaboraven el mPEG-PLA ells mateixos i van provar diferents concentracions de mPEG:PLA (1:1, 1:2, 1:4 i 1:10) en el nostre cas no teníem els recursos necessaris per poder sintetitzar el mPEG-PLA i es va optar per comprar-lo ja feta aquesta a barreja a SigmaAldrich el problema va ser que SigmaAldrich no ens va poder facilitar quina concentració de mPEG:PLA es va comprar. La concentració d'aquests dos polímers és molt important perquè en l'article en qüestió un dels resultats que n'extreuen es que no va ser possible *electrospinnear* les concentracions 1:1 i 1:2, que la concentració 1:4 es podia *electrospinnear* i els *scaffolds* formaven *tumoroids* i en canvi en la concentració 1:10 també es podia *electrospinnear* però els seus *scaffolds* no formaven *tumoroids*.

A continuació, es va buscar a l'article i a la patent diferents concentracions entre mPEG-PLA:PLGA que havien tingut èxit formant *tumoroids* per replicar els *scaffolds*. El PLA es un polímer que es troba en forma L i D/L, en l'article i la patent en cap moment especifiquen quina de les dues formes s'utilitza per l'elaboració dels *scaffolds* per aquest motiu es va decidir comprar compostos mPEG:PLA D/L i L. Finalment es van elaborar aquestes solucions:

- Una solució en forma D/L mPEG-PLA 0'5 g + 2 g PLGA (mPEG-PLA:PLGA 1:4, w/w) dissolt en 8'33 ml de Diclorometà/Cloroform (8:2, v/v).
- Una solució en forma L mPEG-PLA 0'5 g + 2 g PLGA (mPEG-PLA:PLGA 1:4, w/w) dissolt en 10 ml de Diclorometà/Cloroform (8:2, v/v).
- Una solució en forma D/L mPEG-PLA 0'150 g + 2'75 g PLGA (mPEG-PLA:PLGA 1:18, w/w) dissolt en 10 ml de Diclorometà/Cloroform (8:2, v/v).

S'han modificat els volums respectant les concentracions marcades en l'article/patent, per tindre més volum de solució per tal de tenir més marge amb les proves de l'*electrospinning*. Tampoc vam poder elaborar solucions amb volums molt grans com és el cas de les solució de PCL, ja que els polímers de mPEG-PLA i PLGA són molt més cars que no pas el PCL. Per aquest motiu vam haver de descartar una concentració mPEG-PLA:PLGA (3:1, w/w) dissolt en una solució de Diclorometà/Cloroform (8:2, v/v) i tampoc vam tindre suficient material per poder elaborar la forma L de la concentració mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w).

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

Les solucions abans de ser *electrospinnjades* necessitaven tres dies, a temperatura ambient i sense agitació perquè el dissolvent fes el seu efecte. Un cop passats els tres dies, es van començar fer les primeres proves amb aquests compostos.

Tot seguit, un cop fetes les primeres proves vam començar a fabricar els nostres *scaffolds* ja amb el nostre cercle de coure com a mètode de focalització. Per cada una de les tres solucions que teníem vam fabricar dos *scaffolds* amb paràmetres de procés diferents i vam fer tres rèpliques de cada per poder anar al SEM a buscar *beads*.

En la taula 5, observem els paràmetres de procés utilitzats.

Solució	Voltatge (kV)	Flow Rate (mL/H)	Distància al collector (cm)
1-D/L- mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w)	7	5	8
2-D/L- mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w)	6,4	6	8
1-L- mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w)	8	1,5	12
2-L- mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w)	11,26	5	10
1-D/L- mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w)	10	1,5	15
1-D/L- mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w)	12	5	8

Taula 5. Paràmetres de procés per scaffolds mPEG-PLA-PLGA.

Cap de les tres solucions provades es van poder *electrospinnjar* amb els paràmetres de la patent i experimentalment es van haver de trobar els paràmetres més òptims per cada solució. La principal diferència amb les solucions de PCL va ser que amb aquestes compostos s'*electrospinnjaven* amb un *flow rate* molt més elevat. Un cop vam tenir tres rèpliques d'aquests sis *scaffolds* diferents vam anar al SEM per la determinar si hi havia o no *beads*.

5.8 CULTIU CELULAR

Un cop vam acabar de determinar quins scaffolds de mPEG-PLA-PLGA i PCL tenien presència de *beads*, vam començar a dissenyar com seria el nostre cultiu cel·lular. Dels 11 *scaffolds* diferents que vam fabricar entre els dos compostos, 3 *scaffolds* estaven completament lliures de *beads* i vam decidir que aquests els hi fariem un cultiu cel·lular per tal d'estudiar si es formaven *tumoroids* o estructures similars. Vam decidir que fariem cultius a 24 h i 72 h, seguidament aniríem al confocal per veure si s'havien format *tumoroids* a partir de les cèl·lules sembrades. Dels tres *scaffolds* sense *beads* vam fer quatre rèpliques de cada, dos per 24 h i dos per 72 h.

5.8.1 DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES

El primer pas que vam fer per poder realitzar el cultiu va ser la descongelació de les cèl·lules tumorals triple negatiu (MDA-MB-231) que volíem sembrar als nostres *scaffolds*. Abans de descongelar les cèl·lules vam preparar un dissolució de 20 mL de medi suplementat amb 10% FBS, que conté factors de creixement, + 1% d'antibiòtic per evitar contaminacions. Tot seguit,

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

vam abocar aquests 20 ml de dissolució en una placa de Petri i vam descongelar les cèl·lules mitjançant la descongelació ràpida que consisteix en descongelar el nostre criovial amb cèl·lules agitant-lo en aigua temperada a 37°C durant 5 minuts aproximadament. Un cop descongelat el criovial vam abocar les cèl·lules a la placa de Petri i 24 hores després vam haver de realitzar un canvi de medi per tal d'eliminar l'efecte tòxic del crioprotector dimetil sulfòxid (DMSO). Finalment vam deixar la placa de petri a l'incubador a una temperatura de 37 °C, amb una combinació del 95% O₂ i 5% CO₂.

5.8.2 PASSE CEL·LULAR

Un cop descongelades les cèl·lules, mentre esperàvem acabar de fabricar tots els *scaffolds* necessaris pel cultiu cel·lular vam haver de fer diversos passes cel·lulars. És un procediment necessari en tècniques de cultiu cel·lular, ja que les cèl·lules en la placa de Petri creixent exponencialment, si hi ha masses cèl·lules dintre la placa aquestes s'estressen i moren. Aquest procés consisteix en agafar una petita quantitat de cèl·lules de la placa de Petri molt concentrada en cèl·lules i passar aquesta petita quantitat de cèl·lules en una altra placa de Petri totalment nova. Aquests són els passos a seguir per fer un passe cel·lular:

1. Observar al microscopi el creixement cel·lular de la placa de Petri per veure si és necessari un passe cel·lular, normalment es realitzen els passes cel·lulars cada dos dies. És molt important aquest primer pas ja que amb el microscopi podem veure si les cèl·lules han petit algun tipus de contaminació que bé pot provocar la mort cel·lular o que les cèl·lules no creixin tant ràpid com és habitual.
2. Aspirar el medi de la placa de Petri, afegim 3 mL de PBS per tal de netejar les restes de medi que hi pugui haver i aspirem el PBS.
3. Afegim 3 mL de tripsina, un enzim que la seva funció és desenganxar les cèl·lules de la placa de Petri perquè l'enzim faci efecte hem de deixar la placa de petri durant cinc minuts a l'incubador a 37°C. Passats els cinc minuts, comprovem al microscopi que la tripsina hagi fet el seu efecte i per tant hem de veure si movem suaument la placa de petri les cèl·lules es desplacen ja que no estan enganxades a la placa.
4. Fem *flushing*, un procediment que consisteix en pipetejar el doble i una miqueta més de mil·lilitres de medi en comparació amb els mil·lilitres de tripsina, és a dir, 7 mL de medi i anar-lo abocant i pipetejant repetidament per tota la placa de petri per desenganxar les cèl·lules de la placa. Tot seguit es recullen els 10 mL, 7 mL de medi + 3 mL de tripsina + totes les cèl·lules de la placa de Petri a un *falcon*.
5. El *falcon* centrifuguem a 1500 rpm durant 5 minuts, per separar les cèl·lules del medi i de la tripsina. A continuació, aspirem amb molt de compte el sobrenedant, la tripsina i el medi i obtenim el *pellet*, les nostres cèl·lules.
6. Afegim 1 mL de medi a les nostres cèl·lules i amb la nostra pipeta fem *up and down* per tal de barrejar el mil·lilitre de medi amb les cèl·lules, quan ens hem assegurat que han estat ben barrejades, pipetegem un sisena part del mil·lilitre i l'aboquem en una nova placa de Petri.

5.8.3 SEMBRA

Un cop ja vam tenir tots els *scaffolds* fabricats vam fer la sembra. La sembra és un procediment mitjançant el qual introduïm les cèl·lules dintre l'*scaffold* perquè proliferin i en el nostre cas per poder estudiar si es formen o no *tumoroïds*. La sembra és un procediment en què els primers passos són els mateixos que els d'un passe cel·lular. Fins que obtenim el *pellet* de cèl·lules en què en la sembra diluïm les cèl·lules en 2 mL i no en 1 mL com és el cas del passe cel·lular. Hem d'aconseguir un recompte cel·lular entre 20 i 50 cèl·lules a les cambres de Neubauer (Figura 22), sinó fos així haguéssim hagut d'afegir 1 mL de més. Les cambres de Neubauer és una quadricula que ens serveix per poder calcular les cèl·lules que tenim en una dissolució. Consisteix en comptar les cèl·lules que hi ha en els quatre quadrants de cada vèrtex

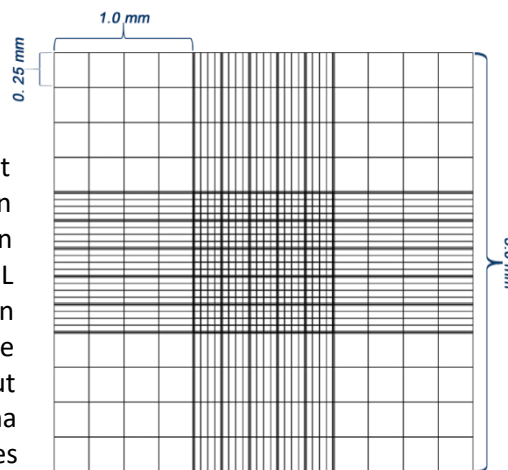


Figura 21. Cambra de Neubauer [55].

de cada cambra de Neubauer. Per poder fer aquest recompte es va fer una dilució en un *ependorf* on pipetegem 80 μL de blau de tripà, colorant que ens servirà per poder veure les cèl·lules i 20 μL de la solució amb cèl·lules que hem diluït anteriorment. A continuació, fem *up and down* amb la dilució de 100 μL dintre de l'*ependorf* perquè les cèl·lules quedin ben barrejades, pipetegem 10 μL de solució i els aboquem a la cambra de Neubauer. Amb el microscopi, comptem les cèl·lules que hi ha en els quatre quadrants que formant els vèrtexs de la cambra i vam contar 45, 43, 27 i 25 cèl·lules en cadascun dels quatre vèrtexs, amb una mitjana de 37,5 cèl·lules per quadrícula. Per tal de saber la concentració de que tenim en la dissolució hem de multiplicar la mitjana pel factor de dissolució que en el nostra cas és 5 i per 10.000 i obtindrem la concentració de cèl·lules per ml que tenim en la nostra solució.

$$37,5 * 5 * 10.000 = 1,875 * 10^6 \frac{\text{celules}}{\text{mL}} \quad \text{Eq. 4}$$

TargetsLab va determinar en base a la línia cel·lular utilitzada i el temps de cultiu que per realitzar la sembra es necessitaven tenir una concentració de 50.000 cèl·lules per cada 75 μL de dissolució. Com bé hem dit anteriorment la sembra la farem en 12 *scaffolds* totals però suposarem que són 15 *scaffolds* ja que d'aquesta manera tindrem més volum per si perdem volum pipetejant les diferents dissolucions. A continuació, hem calculat quantes cèl·lules són necessàries pels nostres 15 *scaffolds*:

$$50.000 \text{ cèlules} * 15 = 750.000 \text{ cèlules} \quad \text{Eq. 5}$$

A continuació hem dividit el nombre total de cèl·lules que necessitem per la concentració de cèl·lules que tenim, per saber el volum necessari de la dissolució concentrada amb cèl·lules que necessitem per tots els *scaffolds*:

$$\frac{750.000 \text{ cèlules}}{1,875 * 10^6 \frac{\text{celules}}{\text{mL}}} = 400 \mu\text{L} \quad \text{Eq. 6}$$

Ara sabem que de la nostra dissolució inicial necessitem 400 μL que contindran 750.000 cèl·lules. A continuació hem calculat el volum total de dissolució que necessitem sabent que sabem que per cada 50.000 cèl·lules necessitem 75 μL de dissolució i hem restat els microlitres totals pels microlitres de solució concentrada amb cèl·lules per obtenir quants microlitres de medi necessitem per complir la condició 50.000 cèl·lules per cada 75 μL .

$$15 * 75 \mu\text{L} = 1125 \mu\text{L totals} \quad \text{Eq. 7}$$

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

$$\begin{aligned} 1125 \text{ ul totals} &- 400 \text{ uL de solució amb cèlules} && \text{Eq. 8} \\ &= 725 \text{ uL de medi} \end{aligned}$$

Tot seguit, en un *ependorf* hem abocat els 400µL de solució concentrada amb cèl·lules i els 725 µL de medi, seguidament hem fet *up and down* perquè les cèl·lules quedessin barrejades per tota la dissolució. Finalment, hem pipetejat i hem abocat 75 µL en forma de cargol repartint la solució per tot l'*scaffold* per cada un dels 12 *scaffolds* que teníem i per acabar hem guardat els *scaffolds* sembrats en l'incubador.

5.8.4 TINCIÓ

Abans d'anar a veure les cèl·lules per estudiar si s'havien format *tumoroids* en les fibres dels *scaffolds*. Vam haver de seguir un protocol de tinció per tal de poder veure les cèl·lules correctament. Per tal de poder seguir el protocol de tinció prèviament es van haver de preparar tres solucions, una de Blocking Buffer, Triton X-100 i Paraformaldehyde.

Preparació Blocking Buffer

Preparem una solució al 3% BSA en PBS (50 ml finals).

1. Afegir 1.5 g de bsa en 50 mL de PBS.
2. Filtrar la solució amb un filtre 0.22 µm.
3. Guardar-ho a 4°C d'un dia per l'altre.

Preparació Triton X-100

Tenim Triton X-100 pur al laboratori.

1. Preparem una solució 0.2% Triton X-100 amb PBS amb agitació (100µL en 50 ml).
2. Filtrem la solució amb un filtre de 0.22 µm.
3. Es guarda a temperatura ambient durant 2 setmanes.

Preparació Paraformaldehyde

Tenim Paraformaldehyde pur al laboratori. El necessitem al 4% però primer el preparem al 8% per, quan el necessitem, diluir-ho 1:2.

1. Per 50 mL finals, afegir 35 mL de PBS en un vas de precipitats a la campana de gasos.
2. Amb un agitador magnètic, escalfar-ho 55-60°C. Vigilant que no bulli.
3. Afegir 4 g de PFA. La pols no es dissoldrà ràpidament. A poc a poc, augmentar el pH afegint NaOH gota a gota fins que la solució es torni transparent.
4. Una vegada dissolt el PFA, la solució s'ha de refredar i filtrar amb el filtre de 0'22 µm.
5. Tornar ajustar el pH fins a 6.9, amb volums petits de HCl.
6. Ajustar el volúmde la solució final a 50 ml amb PBS.
7. Es pot guardar a la nevera fins a un mes des de la seva preparació.

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

Protocol de Tinció

Un cop els *scaffolds* ja havien passat el seu temps d'incubació de 24 hores i 72 hores respectivament es duia a terme el protocol de tinció.

Abans de començar, descongelar les alíquotes de 8% paraformaldehyde i temperar-ho al bany a 37°C. També temperar el blocking buffer (nevera). 2

1. S'aspira el medi dels pous dels *scaffolds* i es fan 2 rentats amb PBS de 5 minuts.
2. Després de l'últim rentat, es fixa amb 4% paraformaldehyde durant 20 minuts a temperatura ambient.
3. Rentar amb PBS.
4. Es permeabilitzen les cèl·lules amb 0,2% Triton X-100 durant 10 minuts a temperatura ambient.
5. Per evitar unions no específiques, s'afageix blocking buffer durant 20 minuts a temperatura ambient.
6. Es tenyeix l'actina del citoesquelet amb rhodamine-phalloidin (1:200), en blocking buffer durant 20 minuts i mantenir a les fosques cobrint els *scaffolds* amb paper d'alumini.
7. Es tenyeix el nucli amb dapi (1/1000) en blocking buffer durant 10 minuts mantenint els *scaffolds* a les fosques.
8. Guardar els *scaffolds* coberts amb paper d'alumini per mantenir-los a les fosques a la nevera.

6.RESULTATS

6.1 SCRENNING DE SCAFFOLDS DE PCL

Les tres solucions de PCL van poder ser *electrospinejades* independentment del mètode de focalització utilitzat. Quatre dels cinc *scaffolds* fabricats amb PCL, els vam poder portar analitzar al SEM, només hi va haver un cas que no vam poder que va ser amb la solució del 8%. Amb la solució de 8% de PCL, la vam poder *electrospinejar* sense cap mena de problema, però alhora d'extreure l'*scaffold* del nostre col·lector gran part del material quedava adherit i obteníem un *scaffold* molt poc uniforme, com es mostra en la figura 24.



Figura 24. Scaffolds 8% PCL.

Vam decidir recobrir el nostre col·lector amb una làmina de metall conductor, es pot veure el muntatge en la figura 25. El que preteníem era estudiar si les fibres es dipositessin sobre la làmina de metall conductor seria més fàcil desenganxar l'*scaffold*. Malauradament, aquesta estratègia tampoc va funcionar i vam decidir no enviar al SEM els *scaffolds* de 8% de PCL ja que obteníem uns *scaffolds* resultants molt poc uniformes degut a la gran pèrdua de material que quedava adherit al col·lector.

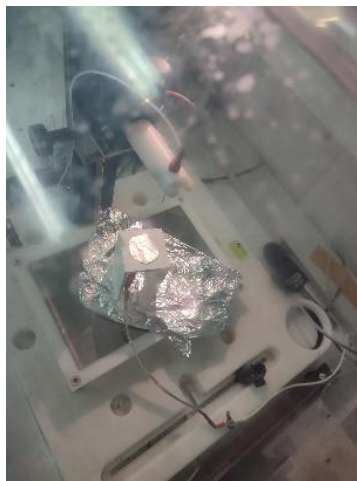


Figura 25. Muntatge per Scaffolds 8% PCL.

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

Per la resta de *scaffolds* de PCL si que els vam poder visualitzar al SEM (Figura 27).

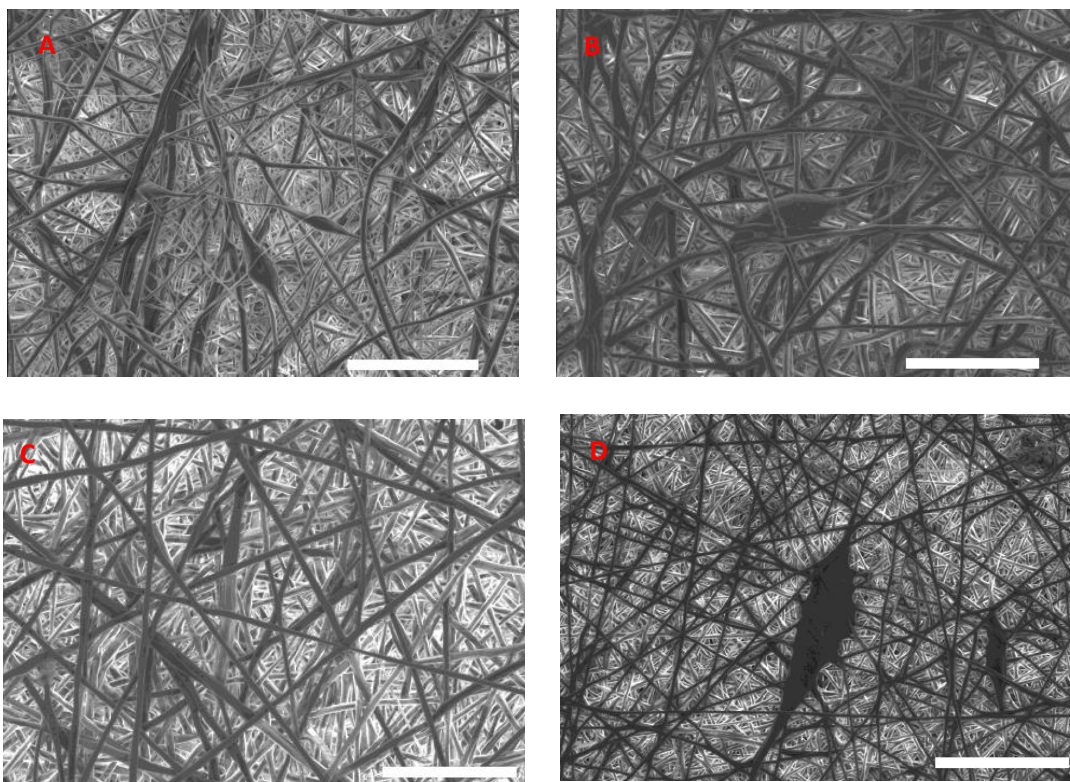


Figura 27. Scanning Electronic Microscopy (SEM) imatges **A)** 10% PCL, **B)** 12% PCL, **C)** 12% PCL + cercle de cure, **D)** 12% PCL + cercle de cure +augmentant el *flow rate scaffolds* (Magnification: x1000 Scale bar: 30 μ m).

L'*scaffold* de la solució de 10% de PCL podem veure que presenta nombrosos *beads* en les fibres del seu *scaffold*, en canvi podem apreciar que l'*scaffold* de 12% de PCL hi ha molt menys *beads* respecte a la solució de 10%. A més a més, en l'*scaffold* de 12% de PCL podem apreciar una espècie de pedretes dipositades sobre l'encreuament de diverses fibres. En la figura de 12% PCL + cercle de cure, en què canviem el mètode de focalització és l'únic d'aquests quatre *scaffolds* analitzats en què no observem la presència de *beads*, tampoc podem apreciar la presència de pedretes que s'han format en l'*scaffold* anterior. Finalment l'*scaffold* de 12% de PCL+ cercle de cure+ augmentant el *flow rate* observem la presència d'un enorme *bead*. En definitiva, l'únic *scaffold* que podem considerar lliure de *beads* i per tant apte pel nostre objectiu del treball és l'*scaffold* de 12% de PCL + cercle de cure.

6.2 SCREENING DE SCAFFOLDS DE mPEG-PLA-PLA

Una de les principals diferències respecte les solucions de PCL es que totes tres solucions que es van preparar de mPEG-PLA-PLA eren molt menys viscoses que les solucions preparades amb PCL. Vam començar a fer les primeres proves amb la solució D/L de concentració mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), vam replicar els paràmetres de procés que hi havia en la patent a 14 kV i 2 mL/h però no vam poder ni aconseguir que la solució fos *electrospinnada*. A continuació vam provar moltes combinacions de paràmetres de procés fins que al final vam poder aconseguir que la solució fos *electrospinnada*, però no aconseguíem mantenir el forma del con de Taylor i s'anava formant un gota tal com es pot apreciar en la figura 28.

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMORIDS.

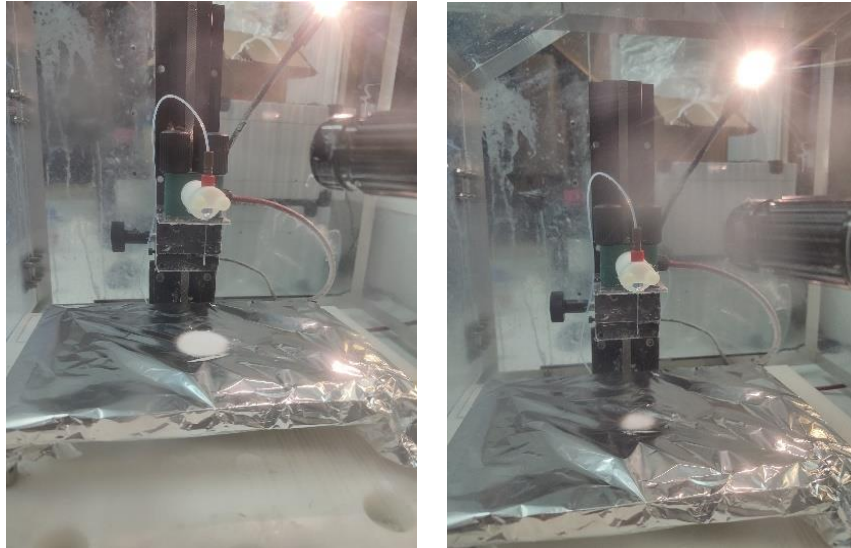
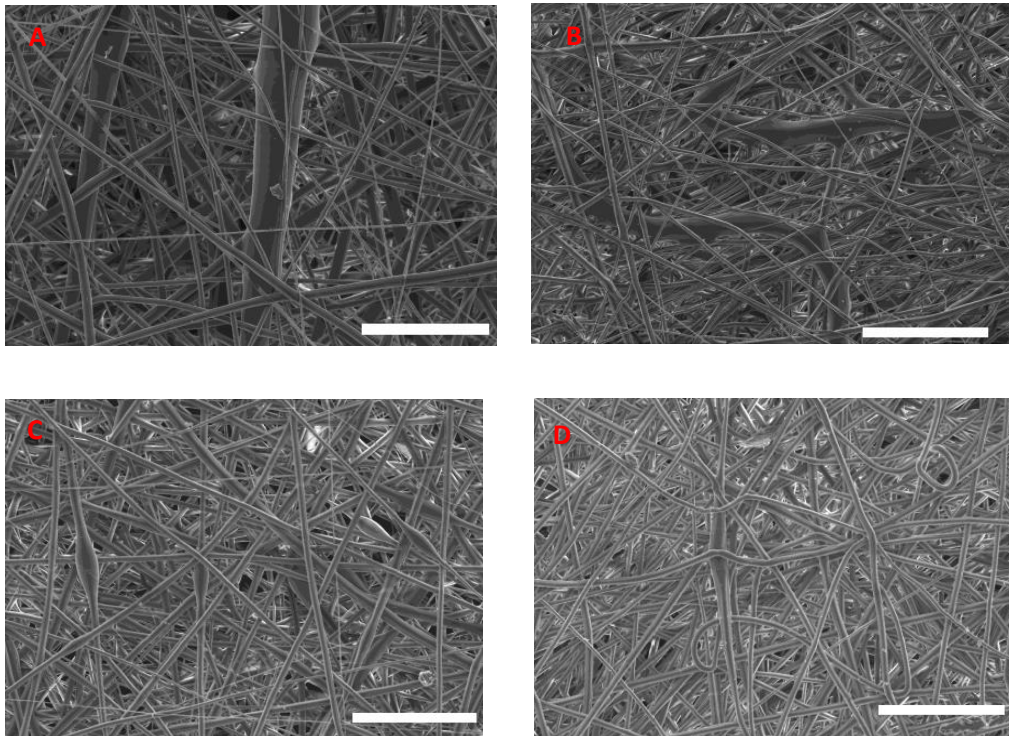


Figura 28. Formació de gotes a la punta de l'agulla durant el procés d'*electrospinning*.

Vam continuar buscant els paràmetres de procés ideals per mantenir el con de Taylor, però no els vam poder trobar perquè finalment sempre es formava la gota i aquesta precipitava causant imperfeccions en els *scaffolds*. Com que el nostre objectiu principal del TFG era saber si amb diferents compostos podíem fabricar *scaffolds* que induïssin la presència de *tumoroids*, vam decidir continuar endavant amb aquests *scaffolds*. Per reduir les seves impureses el que fèiem era cada cop que la gota estava a punt de precipitar l'eixugàvem i així fins que formés un altre cop la gota.

Les tres solucions elaborades amb mPEG-PLA-PLGA van ser *electrospinnades*, amb els problemes esmentats anteriorment i els *scaffolds* van poder ser analitzats pel SEM (Figura 29).



FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

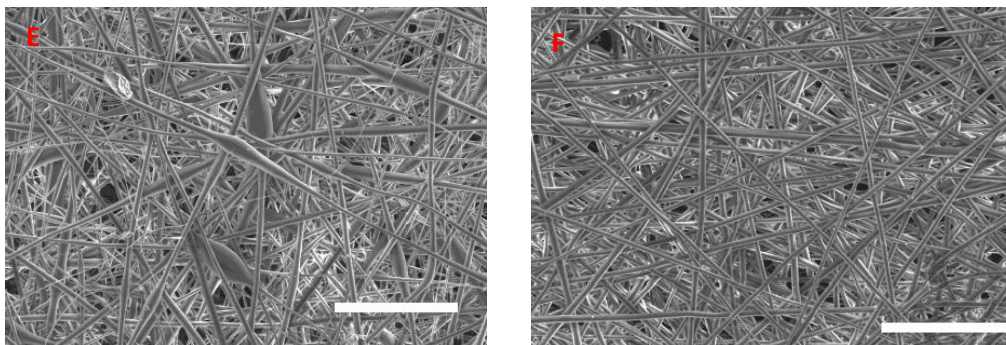


Figura 29. Scanning Electronic Microscopy (SEM) imatges **A)** 1-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **B)** 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **C)** 1-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **D)** 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **E)** 1-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), **F)** scaffolds (Magnification: x1000 Scale bar: 30 μ m).

Els dos *scaffolds* de D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w) fabricats amb paràmetres de procés diferents veiem que presenten *beads*, en les imatges del SEM. L'*scaffold* 1-L mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w) observem que presenta *beads*, d'altra banda canviant els paràmetres de procés l'*scaffold* 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w) veiem que no presenta *beads*. Amb els *scaffolds* D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w) hi ha un resultat similar, l'*scaffold* 1-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w) si que presenta *beads*. No obstant l'*scaffold* 2- D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w) fabricat amb paràmetres de procés diferents no hi ha *beads*. Dels sis *scaffolds* de mPEG-PLA/PLGA fabricats només dos vam considerar que eren aptes pel cultiu cel·lular ja que no presentaven *beads* que eren els *scaffolds* 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w) i 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w).

Amb els tres *scaffolds* seleccionats aptes pel cultiu cel·lular vam fer un estudi del diàmetre de les seves fibres i mida dels porus de l'*scaffold*, podem veure els resultats en la taula 6.

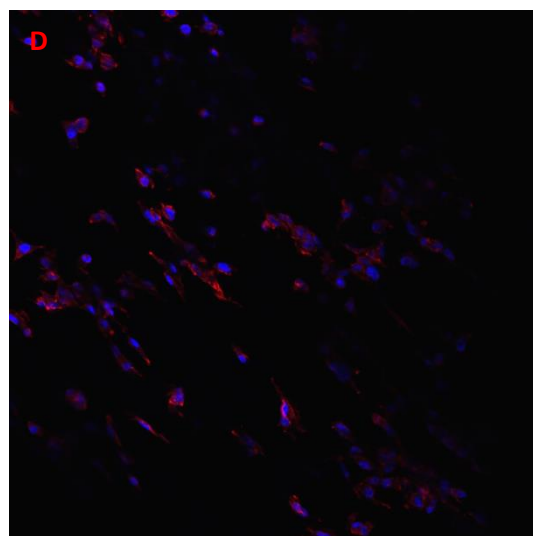
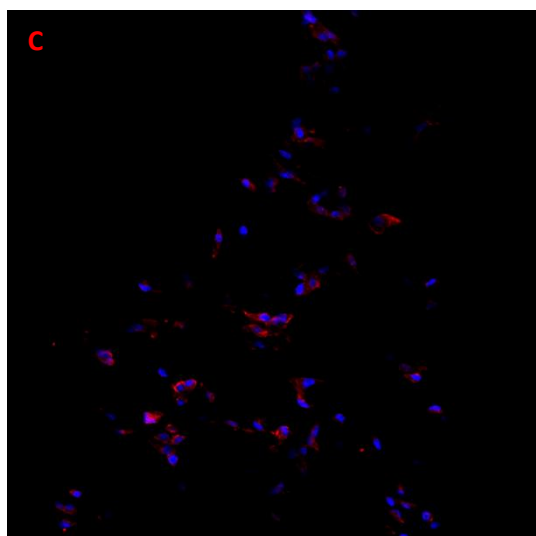
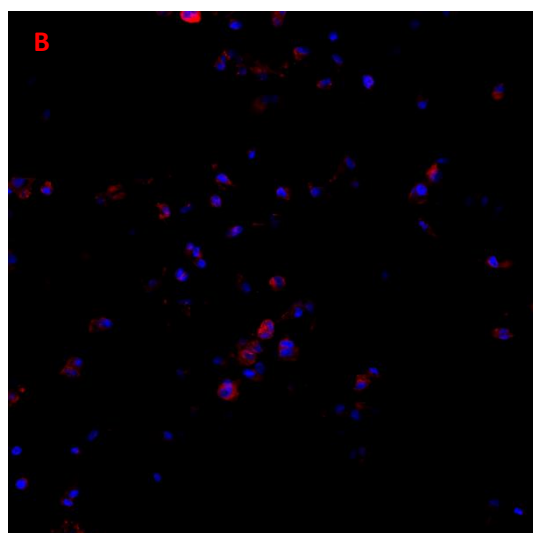
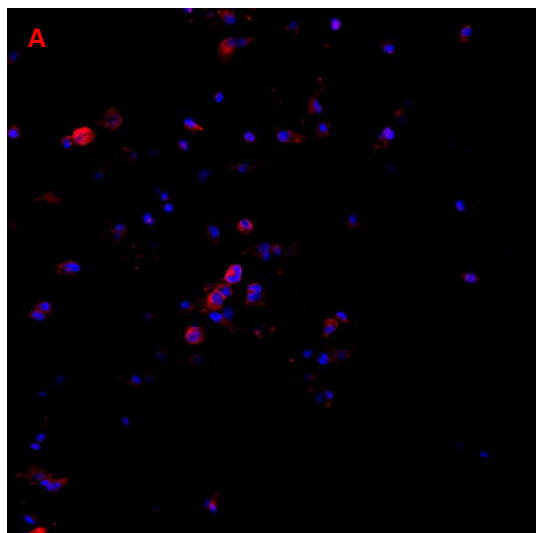
Solució	Diàmetre de fibres (μ m)	Àrea de porus (μ m ²)
12% PCL + cercle de coure	1,7 \pm 0,48	143 \pm 33,08
2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w)	3,15 \pm 0,46	460,78 \pm 200,08
2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w)	2,97 \pm 0,35	421,40 \pm 167,94

Taula 6. Diàmetre de fibres i mida de porus de *scaffolds* seleccionats aptes pel cultiu cel·lular.

Es pot observar que els *scaffolds* mPEG-PLA-PLGA tenen un diàmetre de fibres molt més gran que els *scaffolds* PCL, conseqüentment la mida dels porus també és molt més gran que no pas els *scaffolds* fabricats amb PCL. També observem que les fibres de PCL presenten una variabilitat més gran, en canvi les fibres dels *scaffolds* de mPEG-PLA-PLGA tenen menys variabilitat ja que les seves fibres són molt més uniformes. Qualitativament amb les imatges del SEM també podem veure a simple vista que les imatges de mPEG-PLA-PLGA de la figura 26 tenen fibres més uniformes que no pas les imatges de PCL figura 25. Un cop analitzades el diàmetre de fibres i la mida dels porus de les fibres dels *scaffolds*, hem anat al confocal per estudiar si s'han format *tumoroids* després de 24 i 72 hores després de la sembra de les cèl·lules.

6.3 ESTUDI DE LES CÈL·LULES EN EL CONFOCAL

A continuació podem observar en la figura 30 les fotos obtingudes a partir del confocal per estudiar si en els *scaffolds* s'havien format *tumoroids*.



FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

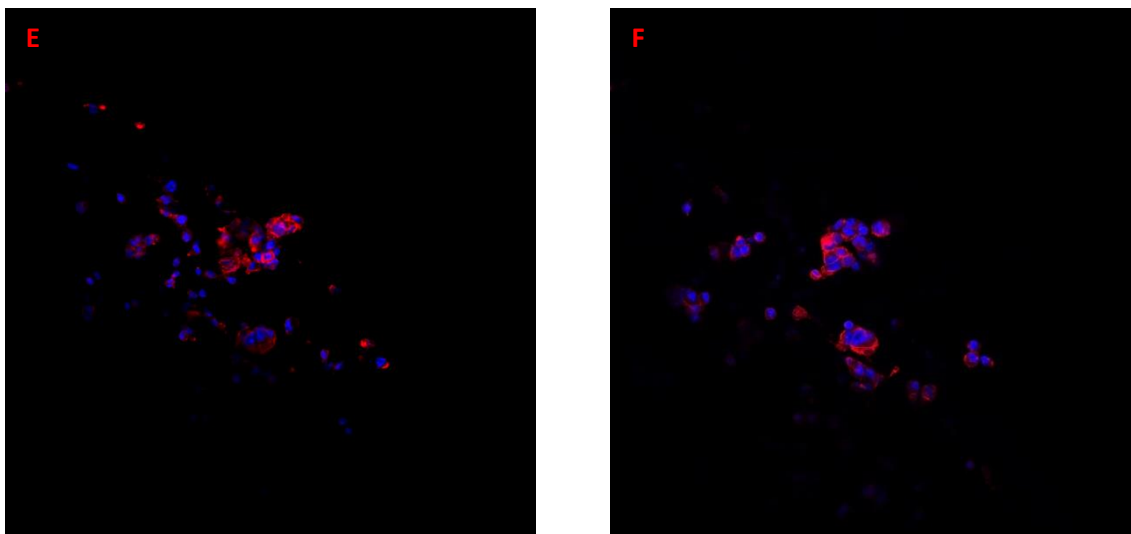
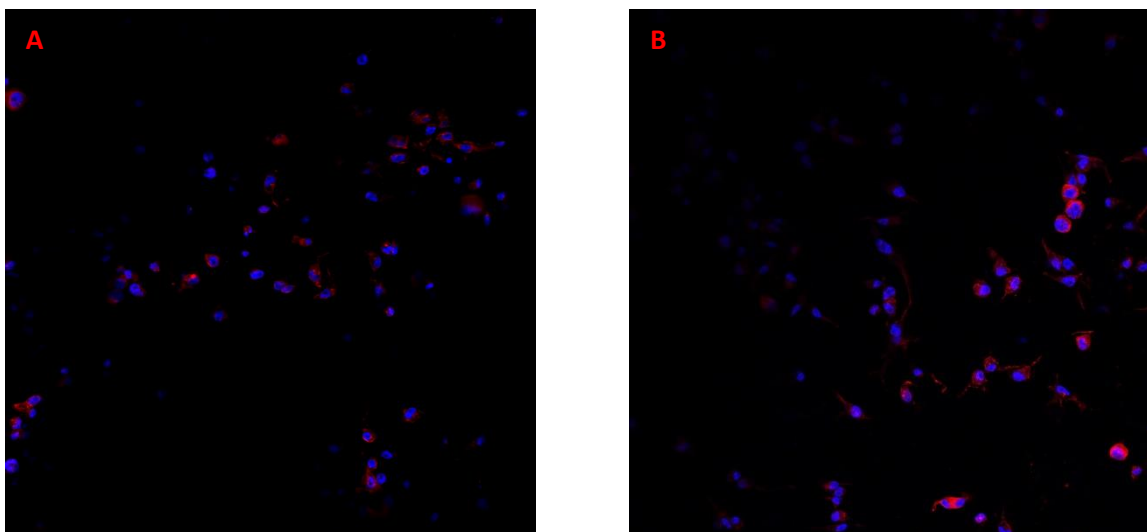


Figura 30. Imatges del CONFOCAL per l'estudi de formació de tumoroids a 24 hores **A)** 12% PCL + cercle de coure, **B)** 12% PCL + cercle de coure, **C)** 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **D)** 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **E)** 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), **F)** 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), *scaffolds* (Magnification: x1000 Scale bar: 30 μ m).

Les imatges del confocal podem distingir el citoplasma de les cèl·lules pel color vermell degut a l'efecte de la *rhodamine-phalloidin* i el nucli de les cèl·lules de color blau degut a l'efecte del dapi. En les figures 30 A) i 30 B) observem que les cèl·lules sembrades en els *scaffolds* de PCL tenen una forma arrodonida respecte a les cèl·lules sembrades en els *scaffolds* 2-L-mPEG-PLA/PLGA (1:4, w/w), que podem observar que el seu citoplasma tenyit de color vermell és molt més allargat que no pas els *scaffolds* de PCL. D'altra banda, els *scaffolds* 2-D/L-mPEG-PLA/PLGA (1:18, w/w) els citoplasmes de les cèl·lules sembrades tenen una forma arrodonida. A més a més, presenten una característica única respecte a la resta de *scaffolds* que a simple vista podem observar hi ha moltes cèl·lules concentrades en una àrea molt concreta el que podria indicar la formació de *tumoroids*, degut a la seva morfologia i que les cèl·lules estan molt aprop unes de les altres afavorint les interaccions entre elles. A 24 hores encara es massa aviat per extreure conclusions sobre quins *scaffolds* poden haver format *tumoroids*, però ja ens poden donar alguns indicis. Si ens fixem en la figura 31 veurem les cèl·lules sembrades a 72 hores.



FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

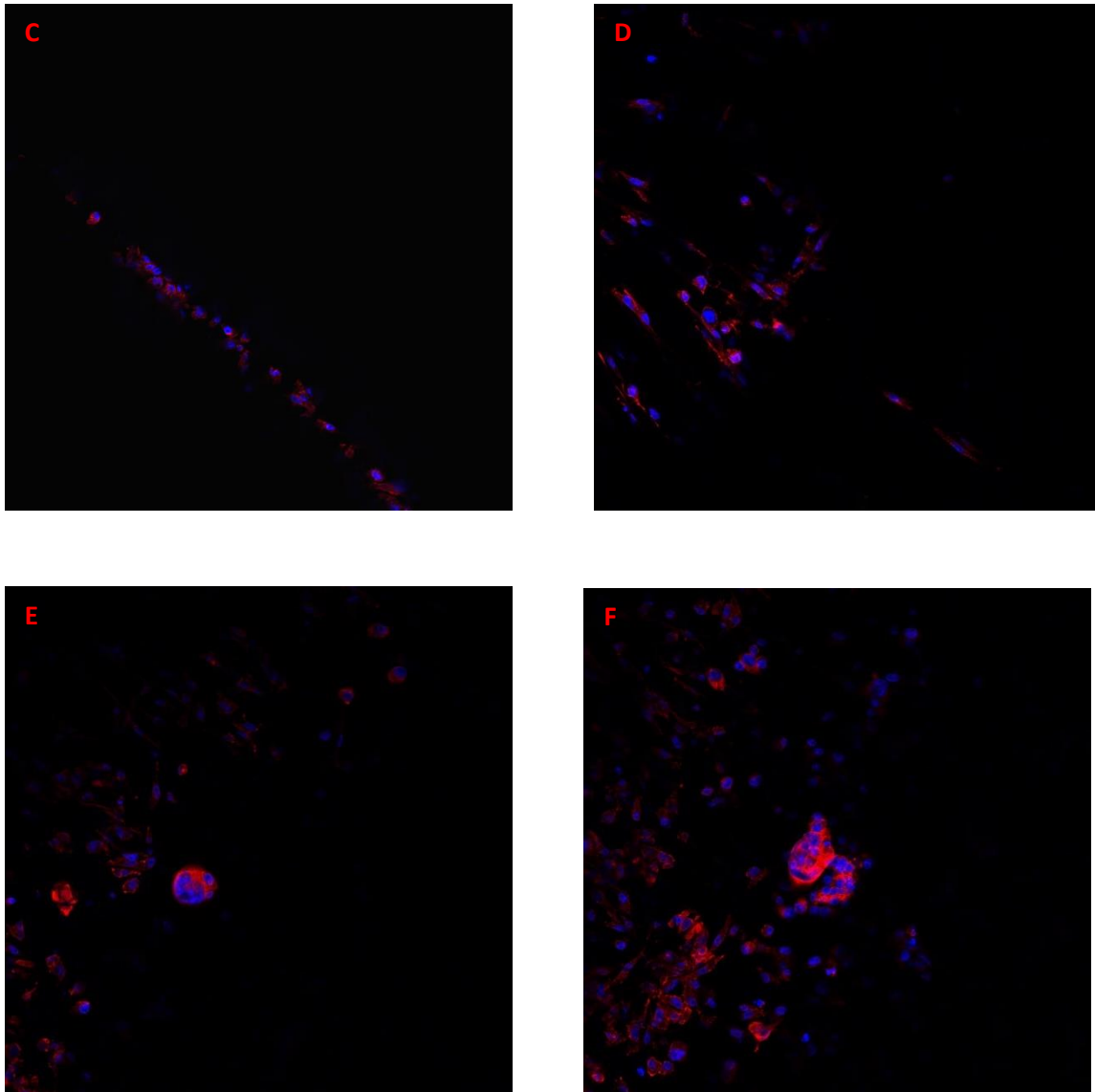


Figura 27. Imatges del CONFOCAL per l'estudi de formació de tumoroids a 72 hores **A)** 12% PCL + cercle de coure, **B)** 12% PCL + cercle de coure, **C)** 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **D)** 2-L-mPEG-PLA:PLGA (1:4, w/w), **E)** 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), **F)** 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), *scaffolds* (Magnification: x1000 Scale bar: 30 μ m).

Les figures 27 E) i F) representen dels *scaffolds* de 2-D/L-mPEG-PLA/PLGA (1:18, w/w), sembla ser que presenten *tumoroids*, o estructures similars. Observem que els conjunts de cèl·lules s'agrupen en una mateixa zona interaccionant entre elles i tenen una morfologia molt arrodonida. Si ens fixem en la resta d'imatges podem veure que en cap de les imatges veiem tantes cèl·lules concentrades en una mateixa zona ni que aquestes hagin format les estructures que veiem en la figura E i F. En la resta de figures podem observar que les cèl·lules estan dispersades, no s'agrupen i que tenen una morfologia allargada típica d'un cultiu en 2D.

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

A continuació, hem analitzat quantitativament la morfologia de les cèl·lules calculant el factor d'elongació. Veiem els resultats a la taula 7.

Solució	Nucli		Citoplasma	
	24 hores	72 hores	24 hores	72 hores
12% PCL +cercle de coure	0,82 ±0,08	0,87±0,05	0,69±0,1	0,53±0,13
1-L-mPEG-PLA/PLGA (1:4, w/w)	0,84±0,1	0,87±0,09	0,66±0,11	0,56±0,14
2-D/L-mPEG-PLA/PLGA (1:18, w/w)	0,93±0,07	0,86±0,07	0,81±0,1	0,84±0,03

Taula 7. Factors d'elongació del nucli i del citoplasma.

Per interpretar els resultats de la taula 7, hem de saber que el que realment és important el factor d'elongació del citoplasma que ens indica la morfologia que presenta les cèl·lules. Si ens fixem en els resultats del nucli, els 3 *scaffolds* presenten un factor d'elongació força elevat en comparació amb el factor d'elongació del citoplasma i en els 3 *scaffolds* tenen un factor d'elongació al nucli similar. Observant els resultats del factor d'elongació del citoplasma veiem que van en concordança amb els les imatges obtingudes a partir del confocal, l'*scaffold* en què les seves cèl·lules presenten un major factor d'elongació és 2-D/L-mPEG-PLA/PLGA (1:18, w/w), l'*scaffold* que hem vist que s'han format els *tumoroids*. D'altra banda, els altres dos *scaffolds* també van en concordança amb els resultats del confocal ja que veiem que la seva mesura no és propera a 1.

7.DISCUSSIÓ

En resposta a la pregunta de recerca, “És possible fabricar estructures en 3D, com són els *scaffolds* fabricats a partir d'*electrospinning* que permetin el cultiu cel·lular de cèl·lules canceroses per formar *tumoroids* fent un *screening* de materials i de diferents concentracions d'aquests materials?”, podem dir que si que ha estat possible fabricar *scaffolds* que en un cultiu amb cèl·lules canceroses que sembla ser que formen *tumoroids*. Dels 11 tipus de *scaffolds* fabricats només en 3 *scaffolds* vam poder obtenir uns *scaffolds* lliures de *beads*. S'ha pogut formar *tumoroids* un dels *scaffolds* fabricats a partir mPEG-PLA/PLGA, amb la forma D/L i amb la concentració mPEG-PLA/PLGA (1:18, w/w).

7.2 LIMITACIONS

Tot i haver aconseguit l'objectiu principal del nostre treball de final grau que era la fabricació d'*scaffolds* mitjançant *electrospinning* fent un *screening* de materials hi ha diverses limitacions presents dintre el treball. La primera de les limitacions és que aquest TFG és un estudi preliminar i que cal repetir els experiments per tal de verificar les teves observacions. Necessitariem repetir la fabricació dels *scaffolds* 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w) per poder verificar que afavoreixen a la formació de *tumoroids*. D'altra banda, també ens hem de fixar en els resultats que no han estat satisfactoris que també seria necessari realitzar més experiments per tal de descartar que els *scaffolds* no poden formar *tumoroids*, sobretot en el cas de les solucions de mPEG-PLA/PLGA que són els presenten uns resultats més prometedors.

Una altra de les limitacions, la trobem en les proves de cultiu realitzades és necessari ampliar la sembra a *scaffolds* de 6 dies. D'aquesta manera podrem observar el comportament de les cèl·lules per tal de veure com les cèl·lules es comporten en un període de temps més prolongat, així podríem veure si en els *scaffolds* de 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w) i continua havent-hi la presència de *tumoroids* i/o si s'han format més *tumoroids* en l'*scaffold*. Finalment, una dels limitacions més grans que han presentat tots els *scaffolds* fabricats a partir de mPEG-PLA-PLGA, són els defectes en la seva superfície ja que en el procés de fabricació no era possible mantenir el con de Taylor estable ja que finalment sempre les gotes de la solució polimèrica acabaven precipitant. És essencial reduir al màxim possible els defectes superficials de l'*scaffold*, si volem que finalment aquests *scaffolds* puguin ser productes comercials pel descobriment de nous fàrmacs contra el càncer.

7.3 CONTRIBUCIONS ALS OBJECTIUS DE DESENVOLUPAMENT SOSTENIBLE (ODS) DE LES NACIONS UNIDES

Els Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS), també coneguts com a Objectius Globals, van ser adoptats per les Nacions Unides el 2015 com una crida universal a l'acció per acabar amb la pobresa, protegir el planeta i garantir que per a 2030 totes les persones gaudeixin de pau i prosperitat. Aquest treball final de grau està directament relacionat amb l'objectiu 3 Salut i Benestar. L'objectiu d'aquest treball ha sigut fer un *screening* de materials per fabricar *scaffolds* per un futur poder continuar la investigació amb els materials més prometedors. No obstant, l'objectiu final i el problema que intenta resoldre aquest treball final de grau és obtenir plataformes de cultiu cel·lular en 3D que permetin el desenvolupament de nous fàrmacs contra el càncer. Els *scaffolds* són una molt bona eina per ser les plataformes de cultiu cel·lular en 3D,

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

ja que són econòmics i són capaços de reproduir respostes molt versemblants referents a l'efecte dels fàrmacs sobre els tumors.

8. CONCLUSIONS

Aquest treball de final de grau el seu objectiu principal era fer un *screening* de diversos materials per determinar si es formaven *tumoroids*, per en un futur TargetsLab pogués aprofundir-hi. Finalment, si que s'han pogut fabricar *scaffolds* que formaven *tumoroids* amb la solució polimèrica de mPEG-PLA/PLGA, però com anteriorment s'ha comentat en les limitacions és necessari fer més rèpliques per demostrar aquests resultats positius són verídics.

Durant la realització d'aquest TFG hem pogut assolir gran part dels objectius plantejats a l'inici del treball, però també és cert que no els hem complert tots. Hem aconseguit fabricar *scaffolds* de PCL lliure de defectes superficials, però en canvi ens ha estat impossible aconseguir *scaffolds* de mPEG-PLA/PLGA sense defectes degut al ja esmentat problema que ens era impossible mantenir el con de Taylor durant el procés d'*electrospinning*. D'altra banda si que hem pogut aconseguir *scaffolds* reproduïbles, utilitzant els mateixos paràmetres de procés i d'una mida similar entre ells, també hem aconseguit fer ús de dos metodologies de focalització diferents. Podem concloure que la presència de *beads* potser degut a molts de factors, però que un dels més determinants són els paràmetres de procés ja que hem vist amb els *scaffolds* de mPEG-PLA/PLGA que tenint la mateixa forma L o D/L i la mateixa concentració però canviant els paràmetres de procés influenciava en la presència de *beads*. També hem vist que depenen de la metodologia de focalització emparada en els *scaffolds* de PCL influenciava en la presència de *beads*. Finalment, una de les conclusions més rellevants que podem extreure és que per formació de *tumoroids* els *scaffolds* de mPEG-PLA/PLGA semblen ser una millor solució que els de PCL, degut a la seva poca hidrofobicitat.

8.1 FUTURE WORK

De les conclusions en què podem extreure d'aquest treball, és que una futura recerca s'ha de basar en la fabricació de *scaffolds* de mPEG-PLA-PLGA. S'ha de continuar fent proves amb mPEG-PLA/PLGA, acabant de provar totes les concentracions i formes proposades de l'article de Yvone Girard "A Three Dimensional Scaffold for Anticancer Drug Development" [42]. Encara hi ha molt marge de millora amb els *scaffolds* de mPEG-PLA-PLGA, perquè va ser de les primeres vegades que va tenir el grup de recerca TargetsLab de treballar amb aquests polímers.

Una de les principals línies de treball seria com aconseguir fabricar els *scaffolds* de mPEG-PLA/PLGA sense la presència de defectes superficials perquè no es pot mantenir la forma del con de Taylor. Una possible solució podria ser fer un muntatge amb l'*electrospinning* en horitzontal i no en vertical, d'aquesta manera les gotes de solució que caiguessin no es dipositarien sobre les fibres de l'*scaffold* i provocarien els defectes superficials.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] W. H. Organization, “Càncer”, 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Jul. 23, 2022).
- [2] Unitat d’Epidemiologia i Registre de Càncer de Girona, “El Càncer a Girona INCIDÈNCIA, MORTALITAT I SUPERVIVÈNCIA”
- [3] W. H. Organization, “Càncer sipnosis” 2020. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1 (accessed Jul. , 2023).
- [4] National Cancer Institute, “What is càncer”, May 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#:~:text=Pittsburgh%20Cancer%20Institute-,The%20Definition%20of%20Cancer,up%20of%20trillions%20of%20cells> (accessed Jul. 23, 2022).
- [5] Unitat d’Epidemiologia i Registre de Càncer de Girona, “El Càncer a Girona INCIDÈNCIA, MORTALITAT I SUPERVIVÈNCIA”
- [6] National Breast Cancer Foundation, “Triple Negative Breast Cancer”, April 2020. <https://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer> (accessed Jul. 24, 2022).
- [7] P. Kumar; R. Aggarwal, “An overview of triple-negative breast cancer. Archives of Gynecology and Obstetrics”, 293(2), 247–269, 2015, doi:10.1007/s00404-015-3859-y
- [8] Won, K. A., & Spruck, C, “Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review)”. *International journal of oncology*, 57(6), 1245–1261, 2020, <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>
- [9] Segeritz, Charis-P, “Basic Science Methods for Clinical Researchers || Cell Culture”. , (), 151–172, 2017, doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
- [10] van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G., “Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods”. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 24(4), 1053–1063, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- [11] Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H., “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue”. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 839–845, 2007, <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
- [12] Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K., “2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures”. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919, 2018, <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- [13] Hickman, J. A., Graeser, R., de Hoogt, R., Vidic, S., Brito, C., Gutekunst, M., van der Kuip, H., & IMI PREDECT Consortium, “Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo”. *Biotechnology journal*, 9(9), 1115–1128, 2014, <https://doi.org/10.1002/biot.201300492>
- [14] Fang, Y., & Eglén, R. M., “Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development”. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 22(5), 456–472, 2017, <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>

- [15] Walker, C., Mojares, E., & Del Río Hernández, A, "Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression". *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3028, 2018, <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>
- [16] Xiong GF, Xu R, "Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression". *J Cancer Metastasis Treat* 2016;2:357-64, 2016, <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2016.08>
- [17] Weaver, V. M., Lelièvre, S., Lakins, J. N., Chrenek, M. A., Jones, J. C., Giancotti, F., Werb, Z., & Bissell, M. J., "beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium". *Cancer cell*, 2(3), 205–216, 2002, [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00125-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00125-3)
- [18] Tatullo, Marco, Marrelli, Benedetta, Benincasa, Caterina, Aiello, Elisabetta, Makeeva, Irina, Zavan, Barbara, Ballini, Andrea, De Vito, Danila, Spagnuolo, Gianrico, "Organoids in Translational Oncology". *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 2774–, 2020, doi:10.3390/jcm9092774
- [19] Ganesh, Karuna; Wu, Chao; O'Rourke, Kevin P.; Szeglin, Bryan C.; Zheng, Youyun; Sauvé, Charles-Etienne Gabriel; Adileh, Mohammad; Wasserman, Isaac; Marco, Michael R.; Kim, Amanda S.; Shady, Maha; Sanchez-Vega, Francisco; Karthaus, Wouter R.; Won, Helen H.; Choi, Seo-Hyun; Pelossof, Raphael; Barlas, Afsar; Ntiamoah, Peter; Pappou, Emmanouil; Elghouayel, Arthur; Strong, James S.; Chen, Chin-Tung; Harris, Jennifer W.; Weiser, Martin R.; Nash, Garrett M.; Guillem, Jose G.; Wei, Iris H.; Kolesnick, Richard N.; Veeraraghavan, Harini; Ortiz, Eduardo J.; Petkovska, Iva; Cercek, Andrea; Manova-Todorova, Katia O.; Saltz, Leonard B.; Lavery, Jessica A.; DeMatteo, Ronald P.; Massagué, Joan; Paty, Philip B.; Yaeger, Rona; Chen, Xi; Patil, Sujata; Clevers, Hans; Berger, Michael F.; Lowe, Scott W.; Shia, Jinru; Romesser, Paul B.; Dow, Lukas E.; Garcia-Aguilar, Julio; Sawyers, Charles L.; Smith, J. Joshua, "A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation". *Nature Medicine*, (), –, 2019, doi:10.1038/s41591-019-0584-2
- [20] Girard, Y. K., Wang, C., Ravi, S., Howell, M. C., Mallela, J., Alibrahim, M., Green, R., Hellermann, G., Mohapatra, S. S., & Mohapatra, S. , "A 3D fibrous scaffold inducing tumoroids: a platform for anticancer drug development". *PloS one*, 8(10), e75345, 2013, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075345>
- [21] Ahmed, Farah Ejaz; Lalia, Boor Singh; Hashaikeh, Raed, "A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and Applications". *Desalination*, 356(), 15–30, 2015, doi:10.1016/j.desal.2014.09.033
- [22] Simon C. Baker; Neil Atkin; Paul A. Gunning; Nick Granville; Karen Wilson; Darren Wilson; Jennifer Southgate. "Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies". , 27(16), 3136–3146, 2006, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.026
- [23] Lina Marcela Duque Sánchez¹, Leonardo Rodríguez², Marcos López, "ELECTROSPINNING: LA ERA DE LAS NANOFIBRAS" ,2013.
- [24] Teo, W E; Ramakrishna, S, "A review on electrospinning design and nanofibre assemblies". *Nanotechnology*, 17(14), R89–R106, 2006, doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

- [25] Electrospintech, “Beads Formation in Electrospinning”, 2014. <http://electrospintech.com/beads.html#.YwjKJnZBy5c> (accessed Jul. 31, 2022)
- [26] He, F. L., Li, D. W., He, J., Liu, Y. Y., Ahmad, F., Liu, Y. L., Deng, X., Ye, Y. J., & Yin, D. C, “A novel layer-structured scaffold with large pore sizes suitable for 3D cell culture prepared by near-field electrospinning”. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 86, 18–27, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.016>
- [27] Rabionet, Marc, Puig, Teresa, Ciurana, Joaquim, “Electrospinning Parameters Selection to Manufacture Polycaprolactone Scaffolds for Three-dimensional Breast Cancer Cell Culture and Enrichment”. *Procedia CIRP*, 65(), 267–272, 2017, doi:10.1016/j.procir.2017.03.341
- [28] Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J. M., Sharifi, S., & Ramakrishna, S., “A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering Applications”. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10(9), 715–738, 2016, <https://doi.org/10.1002/term.1978>
- [29] Glicklis, R., Shapiro, L., Agbaria, R., Merchuk, J. C., & Cohen, S., Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnology and bioengineering*, 67(3), 344–353, 2000, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000205\)67:3<344::aid-bit11>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000205)67:3<344::aid-bit11>3.0.co;2-2)
- [30] Mexpolimeros, “PCL”, 2013. <https://www.mexpolimeros.com/pcl.html> (accessed Aug. 7, 2022).
- [31] ResearchGate, “Estructura química de la policaprolactona PCL”, 2016. https://www.researchgate.net/figure/Figura-7-Estructura-quimica-de-la-policaprolactona-PCL_fig1_309317190 (accessed Aug. 7, 2022).
- [32] Mexpolimeros, “PLA”, 2013. <https://www.mexpolimeros.com/pla.html> (accessed Aug. 7, 2022).
- [33] ResearchGate, “Estructura molecular del poliacido-lactico PLA”, 2018. https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estructura-molecular-del-poliacido-lactico-PLA_fig1_326659989 (accessed Aug. 8, 2022).
- [34] Languino LR, Gehlsen KR, Wayner E, Carter WG, Engvall E, Ruoslahti E. “Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor”. *J Cell Biol.*;109(5):2455-62, 1989, doi: 10.1083/jcb.109.5.2455. PMID: 2530239; PMCID: PMC2115839.
- [35] ResearchGate, “ Chemical structure of poly (lactic- co-glycolic acid) (PLGA)”, 2011, https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-poly-lactic-co-glycolic-acid-PLGA_fig2_262307142 (accessed Aug. 8, 2022).
- [36] Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M, “Chemistry for peptide and protein PEGylation”. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 459–476, 2002, [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00022-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00022-4)
- [37] ResearchGate, “Chemical formula for poly(ethylene glycol)s.”, 2010, https://www.researchgate.net/figure/Chemical-formula-for-polyethylene-glycols_fig3_221909475 (accessed Aug. 8, 2022).
- [38] Wikipedia, “Etanol”, 2022, <https://ca.wikipedia.org/wiki/Etanol> (accessed Aug. 10, 2022).

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE TUMOROIDS.

- [39] Wikipedia, "Diclorometà", 2022, <https://ca.wikipedia.org/wiki/Diclorometà> (accessed Aug. 10, 2022).
- [40] Wikipedia, "Cloroform", 2022, <https://ca.wikipedia.org/wiki/Cloroform> (accessed Aug. 10, 2022).
- [41] Weeber, F., Ooft, S. N., Dijkstra, K. K., & Voest, E. E, "Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery". *Cell chemical biology*, 24(9), 1092–1100, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.012>
- [42] Girard, Yvonne, "A Three Dimensional Scaffold for Anticancer Drug Development", *Graduate Theses and Dissertations*, 2013, <http://scholarcommons.usf.edu/etd/4816>
- [43] Zhong, S., Zhang, Y., & Lim, C. T. "Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: a review". *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(2), 77–87, 2012, <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0390>
- [44] Rnjak-Kovacina, J., & Weiss, A. S. (2011). Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 17(5), 365–372, 2011, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0235>
- [45] Wu, Jinglei, Hong, Yi, "Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration". *Bioactive Materials*, (), S2452199X16300135–, 2016, doi:10.1016/j.bioactmat.2016.07.001
- [46] Pham, Quynh P.; Sharma, Upma; Mikos, Antonios G. (2006). *Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration.* , 7(10), 2796–2805. doi:10.1021/bm060680j
- [47] Taek Gyoung Kim; Hyun Jung Chung; Tae Gwan Park "Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles". , 4(6), 1611–1619, 2008, doi:10.1016/j.actbio.2008.06.008
- [48] Cho, Sung Ju; Jung, Sang Myung; Kang, Munhyung; Shin, Hwa Sung; Youk, Ji Ho "Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility". *Polymer*, 69(), 95–10, 2015, doi:10.1016/j.polymer.2015.05.037
- [49] Wang, Y., Qian, J., Liu, T., Xu, W., Zhao, N., & Suo, A, "Electrospun PBLG/PLA nanofiber membrane for constructing in vitro 3D model of melanoma. *Materials science & engineering*". C, *Materials for biological applications*, 76, 313–318, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.098>
- [50] Mohammadzadeh, L., Rahbarghazi, R., Salehi, R., & Mahkam, M," A novel egg-shell membrane based hybrid nanofibrous scaffold for cutaneous tissue engineering". *Journal of biological engineering*, 13, 79, 2019, <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0208-x>
- [51] Leiva Cepas F. RECONSTRUCCIÓ POR INGENIERÍA TISULAR DE PÉRDIDAS VOLUMÉTRICAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO [Tesis]. Córdoba: Universidad de Córdoba; 2019.

FABRICACIÓ DE *SCAFFOLDS* PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSSES PER LA FORMACIÓ DE *TUMOROIDS*.

- [52] Wikipedia, "Microscopio electrónico de barrido", 2022, https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido (accessed Aug. 25, 2022).
- [53] Wikipedia, "Microscopio confocal", 2022, https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_confocal (accessed Aug. 25, 2022).
- [54] Subhra Mohapatra, Shyam S. Mohapatra. "Provided herein is a three-dimensional scaffold composition comprising randomly oriented fibers, wherein the fibres comprise a polyethylene glycol-polylactic acid block copolymer (PEG-PLA) and a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). Also provided are methods for using the three dimensional scaffolds described herein". US9618501B2 (Patent) 2011.
- [55] Blog del Manual del Laboratorio, "Cámara de Neubauer ", 2018, <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/> (accessed Aug. 25, 2022).

ANNEX A PLANIFICACIÓ

Aquest annex proporciona l'informació de les tasques desenvolupades durant la realització d'aquest TFG. He realitzat una estimació dels dies que he estat dedicant a fer cada d'una de les tasques principals d'aquest TFG, podem veure en la figura 28 la data de començament, d'acabament i la durada de les tasques que he anat realitzant durant el desenvolupament del TFG.

#	Activity	Start	End	Day
1	Recerca	24-febr-22	10-març-22	14
2	Fabricació Scaffolds PCL	17-març-22	11-jul-22	116
3	Scaffolds 8%	25-abr-22	12-maig-22	17
4	Scaffolds 10 %	17-març-22	11-abr-22	25
5	Scaffolds 12 %	8-abr-22	11-jul-22	94
6	Nou mètode de focalització	19-maig-22	18-jul-22	60
7	SEM	16-maig-22	5-jul-22	50
8	Fabricació Scaffolds mPEG-PLA-PLGA	9-juny-22	19-jul-22	40
9	D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:4)	9-juny-22	22-juny-22	13
10	L-mPEG-PLA:PLGA (1:4)	16-juny-22	19-jul-22	33
11	D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18)	21-juny-22	18-jul-22	27
12	Cultiu Cel·lular	5-jul-22	25-jul-22	20
13	CONFOCAL	21-jul-22	26-jul-22	5
14	Esriptura de memria	18-jul-22	29-ag-22	42
15	Revisió de memòria	29-ag-22	5-set-22	7

Figura 29. Tasques Desenvolupades

La figura 29 és una estimació de la durada bastant precisa del temps que m'ha comportat desenvolupar cada tasca. Primer de tot vaig començar amb una tasca de recerca per informar-me de tot el que era necessari per saber pel desenvolupament correcte del TFG. A continuació vam començar amb la fabricació dels *scaffolds* de PCL, després a mesura que vam obtenir els primers *scaffolds* de PCL vam anar al SEM per comprovar si tenien *beads* o no. Simultaniament, vam introduir un nou mètode de focalització, vam començar a fabricar *scaffolds* de mPEG-PLA-PLGA a mesura que anàvem portant analitzar les mostres al SEM. Durant el mes de juliol vam començar les tècniques de cultiu i durant la setmana del 18 de juliol vam fer la sembra un cop fabricats tots els *scaffolds* necessaris. Seguidament vam analitzar les mostres al confocal. A partir de mitjans de juliol vam començar la redacció de la memòria del TFG que va acabar l'última setmana d'agost per tenir temps de fer una revisió extensiva fins a la seva entrega.

En la figura 29 podem veure el diagrama de Gantt de les tasques desenvolupades. Si ens fixem durant les primeres setmanes del desenvolupament del projecte el ritme per realitzar cada tasca era molt més lent, ja que encara era període de classes. Però un cop acabat el període lectiu vaig poder dedicar molt més de temps en el projecte sent capaç de realitzar diverses tasques a la setmana.

FABRICACIÓ DE SCAFFOLDS PEL CULTIU CEL·LULAR DE CÈL·LULES CANCEROSES PER LA FORMACIÓ DE TUMORIDS.

Project Start Date: 21-febr-22
 Project Name: TFG
 Week Starting:

#	Activity	Start	End	Day
1	Recerca	24-febr-22	10-març-22	14
2	Fabricació Scaffolds PCL	17-març-22	11-jul-22	116
3	Scaffolds 8%	25-abr-22	12-maig-22	17
4	Scaffolds 10%	17-març-22	11-abr-22	25
5	Scaffolds 12%	8-abr-22	11-jul-22	94
6	Nou mètode de focalització	19-maig-22	18-jul-22	60
7	SEM	16-maig-22	5-jul-22	50
8	Fabricació Scaffolds mPEG-PLA-PLGA	9-juny-22	19-jul-22	40
9	D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:4)	9-juny-22	22-juny-22	13
10	L-mPEG-PLA:PLGA (1:4)	16-juny-22	19-jul-22	33
11	D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18)	21-juny-22	18-jul-22	27
12	Cultiu Cel·lular	5-jul-22	25-jul-22	20
13	CONFOCAL	21-jul-22	26-jul-22	5
14	Esriptura de memria	18-jul-22	29-ag-22	42
15	Revisió de memòria	29-ag-22	5-set-22	7

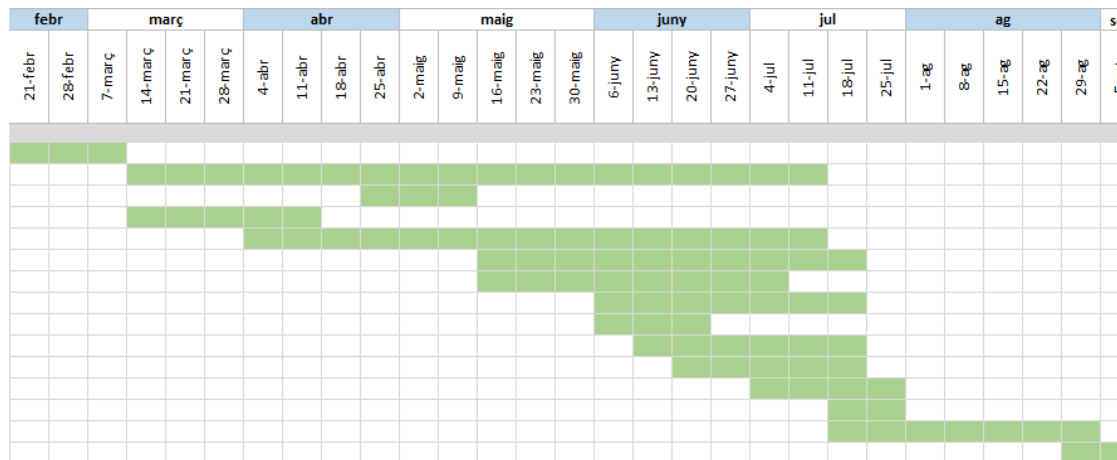


Figura 29. Diagrama de Gantt