

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

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. El càncer de mama triple és característic per la falta de receptors d'estrogen, progesterona i nivells molt baixos del factor de creixement epidèrmic humà (HER2) negatiu, per aquest motiu 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 són poc més d'un 5%. El desenvolupament dels nous fàrmacs quimioterapèutics segueix un procediment 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. 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. Gràcies als cultius en 3D es poden formar *tumors*, 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, l'estructura cel·lular del tumor i 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. La funció principal d'aquestes bastides és imitar la funció de la matriu extracel·lular (ECM) *in vivo*. L'ECM 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 l'elasticitat dels teixits. Quan hi ha metastasi, es veuen canvis significatius en l'ECM que pateix canvis significants en la seva arquitectura. 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 *tumors*.

Hi ha diverses tècniques per fabricar els *scaffolds* 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. L'*electrospinning* és una tècnica de fabricació additiva que consisteix en la dissolució d'un polímer en un solvent volàtil i 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 els *beads*. 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* i eviten la formació de *tumoroids*.

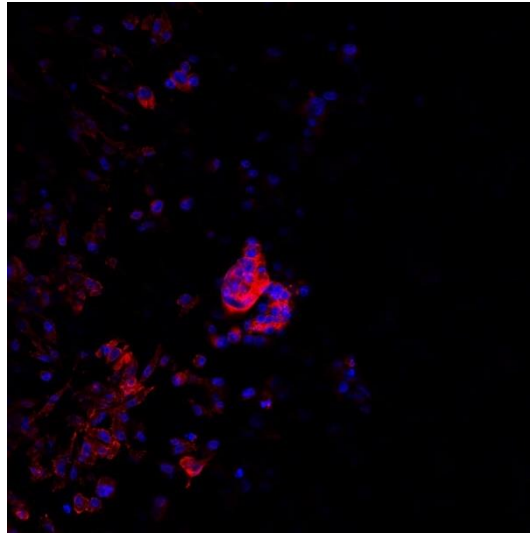
L'objectiu principal d'aquest TFG és fer un *sreening* amb diversos materials, en diferents concentracions, per tal de fabricar diversos *scaffolds* mitjançant *electrospinning* per determinar quins *scaffolds* afavoreixen la presència de *tumoroids* per en un futur fer una recerca més exhaustiva amb aquests materials.

La policaprolactona (PCL) va ser un dels polímers utilitzats per la fabricació d'*scaffolds* ja que és un polímer biocompatible, *electrospinnable* i econòmic. A més a més, prèviament a la realització del meu TFG 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*. L'altre material que va ser utilitzat per la fabricació d'*scaffolds* va ser un copolímer de mPEG-PLA-PLGA, que vam extreure de l'article de l'Yvone Girard "A Three Dimensional Scaffold for Anticancer Drug Development". El mPEG-PLA-PLGA és una combinació de diferents polímers que són més hidròfils que el PCL i per tant presenten un major adhesió cel·lular. 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 definitiva vam elaborar diverses dissolucions polimèriques amb concentracions diferents d'aquests dos materials.

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. La primera de les metodologies que vam utilitzar va consistir en l'ús d'un suport de base en què hi muntàvem un col·lector de 3,3 centímetres de diàmetre d'acer inoxidable tipus 316, en què les fibres obtingudes a partir d'*electrospinning* es dipositaven sobre el col·lector amb l'objectiu final d'obtenir *scaffolds* sempre de la mateixa mida. La segona de les metodologies que va ser emparada consistia en l'ús d'un elèctrode auxiliar, en aquest cas un cercle de coure per tal de controlar la trajectòria de les fibres i que es dipositessin sobre una àrea determinada amb l'objectiu final d'obtenir *scaffolds* sempre de la mateixa mida.

En total es van fabricar 11 tipus de *scaffolds* diferents segons el material, la concentració, el mètode de focalització i els paràmetres de procés utilitzats. Amb el *Scanning Electron Microscope* (SEM), un tipus de microscopi electrònic capaç de produir imatges d'alta resolució de la superfície d'una mostra, vam observar que només 3 dels 11 *scaffolds* eren lliures de la presència de *beads*. Aquests 3 *scaffolds* vam considerar que eren aptes pel cultiu cel·lular pel propòsit del TFG. Vam decidir que sembràriem amb cèl·lules als *scaffolds* i que després aniríem al *Confocal Laser Scanning Microscope*, per estudiar si les cèl·lules un cop sembrades als *scaffolds* aconseguien formar *tumoroids*.

Només en 1 dels 3 *scaffolds* sembrats sembla ser que presenten *tumoroids*, o estructures similars que podem veure en la figura 1.



**Figura 1.** Imatges del CONFOCAL de l'*scaffold* 2-D/L-mPEG-PLA:PLGA (1:18, w/w), que sembla presenta tumoroids.

En aquesta imatge podem veure conjunts de cèl·lules s'agrupen en una mateixa zona, amb un morfologia arrodonida típica de la formació de *tumoroids*. En la resta d'*scaffolds* no vam veure resultats similars ja que ni tantes cèl·lules es concentraven en una mateixa zona ni tenien una morfologia arrodonida.

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 que aquest TFG és un estudi preliminar i que cal repetir els experiments per tal de verificar les teves observacions, tant els resultats positius com els resultats negatius.