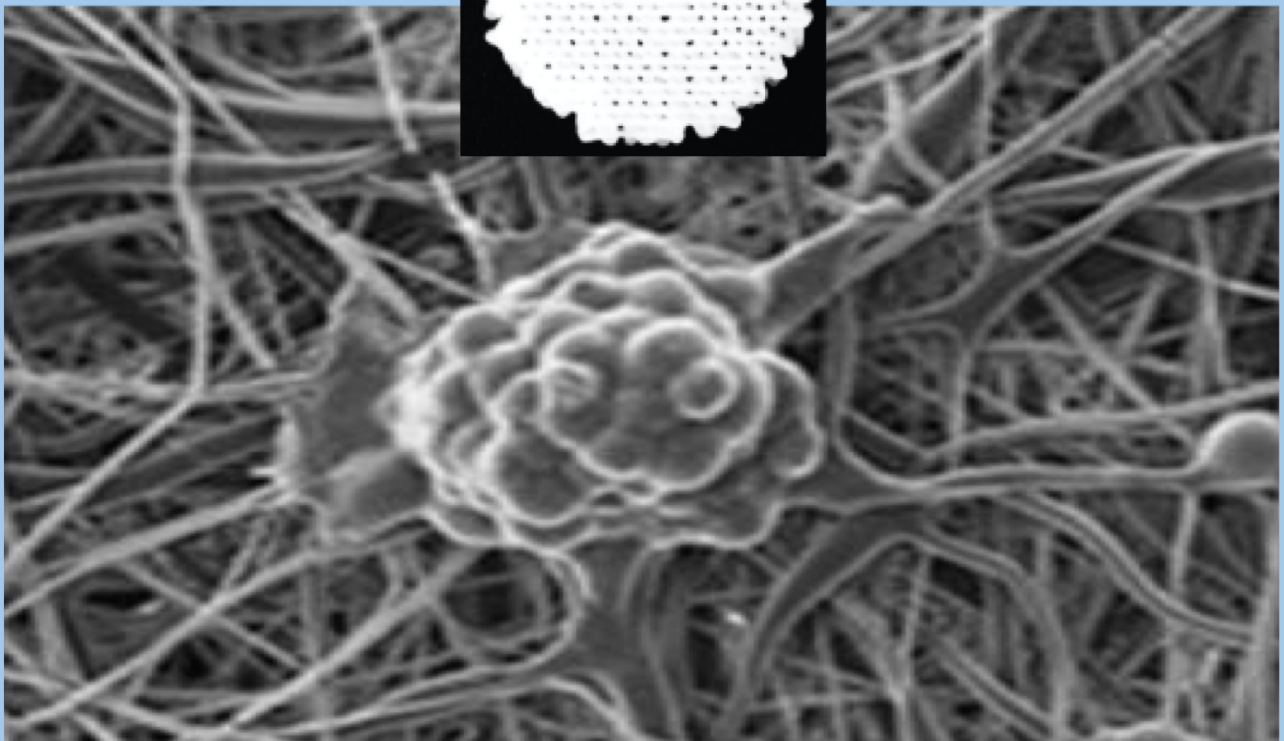
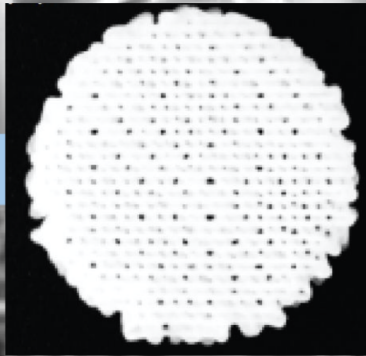


**El cultiu i l'expansió de
cèl·lules mare tumorals: les
grans desconegudes**



AGRAÏMENTS

El meu treball de recerca no hauria estat possible sense l'ajuda desinteressada de diverses persones i entitats a les qui vull mostrar el meu sincer agraïment.

Primer de tot, m'agradaria donar les gràcies al meu tutor [REDACTED] [REDACTED] per haver-me aconsellat i ajudat en tot moment. Per la seva paciència i dedicació, i haver-me guiat durant el desenvolupament del treball.

El present treball de recerca s'ha realitzat amb l'ajuda i gràcies a dos grups de recerca de la Universitat de Girona: el Grup de Recerca en Noves Dianes Terapèutiques (*TargetsLab*; www.udg.edu/targetslab), de la Facultat de Medicina i el Grup de Recerca en Enginyeria de Procés, Producte i Producció (*GREP*), de l'Escola Politècnica Superior. M'agradaria expressar el meu agraïment a tots els investigadors i investigadores que m'han ajudat, ensenyat i explicat diferents tècniques i conceptes que han estat claus a la realització del treball, especialment la Dra. Sònia Palomeras i al doctorand Andreu Franquesa, que han dedicat el seu temps a formar-me durant la meva estada al laboratori i que sense la seva ajuda no hauria pogut realitzar aquest treball de recerca. Gràcies a ells dos he pogut aprendre el màxim d'aquesta experiència de la manera més agradable possible.

També donar gràcies a la meva mare [REDACTED] professora de la Facultat de Medicina de la UdG, per haver-me donat l'oportunitat de poder realitzar la part pràctica a *TargetsLab* i de poder accedir a un laboratori de molta qualitat científica i humana per poder-hi realitzar diferents proves i experiments, a pesar de les restriccions de la pandèmia. També per donar-me consells i pautes a seguir per redactar aquest treball.



Girona, 1 de setembre de 2021

Teresa Puig Miquel, Catedràtica i Directora del Grup de Recerca *TargetsLab* de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona, certifica que:

_____ ha assistit com estudiant de Batxillerat en pràctiques al laboratori de recerca *TargetsLab* els mesos d'estiu (Juny i Juliol) del 2021 per a la realització de la part experimental del seu treball de recerca.

Maria
Teresa
Puig
Miquel -
DNI
77914674N
(TCAT)

Firmado digitalmente por Maria Teresa Puig Miquel - DNI 77914674N (TCAT) Fecha: 2021.09.02 17:50:22 +02'00'

Prof. Dr. Teresa Puig Miquel
Serra Hünter Full Professor
New Therapeutic **TargetsLab**
Medical Science Dept
School of Medicine
University of Girona

c/ Emili Grahit, 77
17003 Girona -Spain-
+34 972419628
www.udg.edu/targetslab

Figura 1: Certificat digital conforme he assistit al laboratori *TargetsLab* de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona.

RESUM

El càncer de mama triple negatiu (TNBC, *triple-negative breast cancer*) representa aproximadament el 20% de tots els casos de càncer de mama (BCa, *breast cancer*), sent el més agressiu i amb pitjor pronòstic. Actualment, a causa de la manca de dianes terapèutiques específiques d'aquest subtipus de BCa, la quimioteràpia és l'únic tractament disponible. En els últims anys s'ha assenyalat una petita població de cèl·lules tumorals amb propietats de cèl·lules mare com a principals responsables del mal pronòstic i recaigudes d'aquesta subtipus de BCa anomenades cèl·lules mare tumorals (BCSC, *breast cancer stem cells*). Per aquest motiu s'ha vist aquest fet com una nova diana terapèutica per desenvolupar nous agents dirigits a TNBC i especialment a l'eliminació de les BCSC.

Tradicionalment, s'ha utilitzat el cultiu en dues dimensions (2D) per cultivar cèl·lules, és a dir, superfícies de poliestirè conegudes com a plaques de Petri. Aquestes plaques permeten que les cèl·lules creixin i es divideixin exponencialment. No obstant això, aquest sistema de cultiu no mimetitzava correctament el microambient tumoral. En aquests últims anys diferents grups de recerca han començat a créixer i cultivar cèl·lules en tres dimensions (3D) amb l'objectiu d'aconseguir un cultiu més similar al present en el teixit mamari. Hi ha diferents sistemes de cultiu en 3D com solucions de *matrigel* o estructures generades amb diferents biomaterials com els *scaffolds*. En el present treball es pretén generar i cultivar cèl·lules en unes estructures en 3D (*scaffolds*) amb l'objectiu d'enriquir, expandir i caracteritzar la subpoblació de BCSCs en mostres cel·lulars de TNBC i així doncs, facilitarà el desenvolupament i l'estudi de teràpies dirigides contra aquest subtipus de càncer.

En aquest treball s'ha estudiat la capacitat de proliferació d'una línia cel·lular de TNBC (línia cel·lular: MDA-MB-468) cultivada en 2D i en 3D (*scaffolds*). Posteriorment, s'ha avaluat l'enriquiment de la població de BCSCs cultivades en *scaffolds* mitjançant l'anàlisi de l'expressió de gens específics de la població de BCSC: CD24, CD44, ALDH1 en comparació amb un gen control (GAPDH).

RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC, *triple negative breast cancer*) representa aproximadamente el 20% de todos los casos de cáncer de mama (BCa, *breast cancer*), siendo el más agresivo y con peor pronóstico. Actualmente, debido a la falta de dianas terapéuticas específicas de este subtipo de BCa, la quimioterapia es el único tratamiento disponible. En los últimos años se ha señalado una pequeña población de células tumorales con propiedades células madre como principales responsables del mal pronóstico y recaídas de este subtipo de BCa, nombradas células madre tumorales (BCSC, *breast cancer stem cells*). Por este motivo se ve este hecho como una nueva diana terapéutica para desarrollar Nuevos agentes dirigidos al TNBC y especialmente a la eliminación de las BCSC.

Tradicionalmente se ha utilizado el cultivo en dos dimensiones (2D) para cultivar células, superficies de poliéster conocidas como Placas de Petri. Estas placas permiten que las células crezcan y se dividan exponencialmente. No obstante, este sistema de cultivo no mimetiza correctamente el microambiente tumoral. Estos últimos años diferentes grupos de investigación han empezado a crecer y cultivar células en tres dimensiones (3D) con el objetivo de conseguir un cultivo más similar al presente en el tejido mamario. Hay diferentes sistemas de cultivo en 3D como las soluciones de *matrigel* o estructuras generadas con diferentes biomateriales como los *scaffolds*. En este trabajo se pretende generar y cultivar células en unas estructuras en 3D (*scaffolds*) con el objetivo de enriquecer, expandir y caracterizar la subpoblación de BCSCs en muestras celulares de TNBC para poder facilitar el desarrollo y el estudio de las terapias dirigidas contra este subtipo de cáncer.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de proliferación de una línea celular de TNBC (línea celular: MDA-MB-468) cultivada en 2D y 3D (*scaffolds*). Posteriormente se ha evaluado el enriquecimiento de la población de BCSCs cultivadas en *scaffolds* mediante el análisis de expresión de genes específicos de la población BCSC: CD24, CD44 y ALDH1 en comparación a un gen control (GAPDH).

ABSTRACT

The Triple-negative breast cancer (TNBC) presents approximately the 20% of all breast cancer (BCa) cases, being the most aggressive one and having the worst prognostic. Nowadays, due to the lack of specific therapeutic targets of this BCa subtype, the chemotherapy is the only treatment. During the last years, one small tumoral cell population with stem cells properties have been identified as the responsible of the bad prognostic and the reappearance of the tumour, known as breast cancer stem cells (BCSC).

Traditionally cells have been cultivated in two dimensions (2D), surfaces made of polyester known as Petri dishes. These dishes let cells grow and divide exponentially. However, this system doesn't imitate the tumoral microenvironment correctly. These last years, different scientific research groups have started to cultivate and grow cells in three dimensions (3D) with the aim of getting a cultivation similar to the one found in the breast tissue. There are different systems of 3D culture, like the solutions of matrigel or structures made up with biomaterials like scaffolds. In this project the intention is to create 3D structures (scaffolds) and cultivate cells with the aim of improving, expanding, and characterizing the subpopulation of the BCSCs with TNBC cell samples, in order to facilitate the development and study of therapies for this cell subtype.

In this project it has been studied the proliferation capacity of a cell line of TNBC (cell line: MDA-MB-468) cultivating them in 2D and 3D surfaces. Subsequently, the enrichment of the population of the cultivated BCSCs in the 3D cultivation has been evaluated with the analysis of the expressions of some specific gens of the BCSC: CD24, CD44 and ALDH1 comparing them to the control gen GAPDH.

ABREVIACIONS

ADN/ DNA	Àcid desoxiribonucleic
AECC	Associació espanyola contra el càncer
ALDH	Aldehid deshidrogenasa
ARN/ RNA	Àcid ribonucleic
BCa	Breast cancer
BCSC	Breast cancer stem cells
CSC	Cancer stem cells
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNPSs	Desoxinucleòsid-trifosfat
2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ECM	Matriu extra cel·lular
ER	Receptors d'estrogen
ES	Electrospinning
FFF	Fused filament fabrication
GAPDH	Gliceraldehid 3-fosfato deshidrogenes
HER	Human epidermic receptor
H ₂ O	Aigua
MCF	Michigan cancer foundation
NCSC	Non-cancer stem cells
PBS	Tampó fosfat salí /phosphate buffered saline
PCL	Polyε-caprolactone
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
pHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
PR	Receptors de progesterona
rpm	Revolucions per minut
RTPCR	Real-time PCR
SEM	Desviació estàndard
TFG	Treball de fi de grau
TFM	Treball de fi de màster
TNBC	Triple negative breast cancer

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	3
RESUM	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ABREVIACIONS	8
ÍNDEX	9
INTRODUCCIÓ	10
MARC TEÒRIC	13
1. CÀNCER DE MAMA	13
2. CÀNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIU (TNBC)	15
3. CÈL·LULES MARE TUMORALS (CSC)	16
4. CULTIUS CEL·LULARS 2D	21
5. CULTIUS CEL·LULARS 3D	22
6. COMPARACIONS CULTIU 2D vs 3D	24
7. TECNOLOGIES D'IMPRESSIÓ 3D	27
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	32
METODOLOGIA	34
1. FABRICACIÓ DEL <i>SCAFFOLD</i>	34
2. CULTIU CEL·LULAR	36
3. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR <i>MTT</i>	40
4. EXTRACCIÓ RNA	40
5. RETROTRANSCRIPCIÓ	42
6. <i>REAL-TIME</i> PCR (RT-PCR)	43
7. ANÀLISIS	45
RESULTATS I DISCUSSIÓ	47
1. <i>SCAFFOLDS</i> DE NANOFIBRES	47
2. PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES TRIPLE-NEGATIVES 468 EN 2D VERSUS 3D	48
3. MARCADORS DE LA POBLACIÓ BREAST CANCER STEM CELLS	50
CONCLUSIONS	53
BIBLIOGRAFIA	54

INTRODUCCIÓ

Aquest treball engloba diferents àmbits que em generen un gran interès per diversos **motius**. Primerament hi trobem el càncer. Com tots sabem aquest malauradament està molt present a les nostres vides i no de forma molt agradable. Tot i així, a dia d'avui jo he tingut la sort de no conèixer-lo de prop. Així doncs el meu interès en el càncer ha vingut donat de tenir present a la meua vida una persona, la meua mare, que ha dedicat gran part de la seva carrera a la recerca contra el càncer; concretament el càncer de mare triple negatiu, el més agressiu d'aquesta família. Ha sigut tutora i investigadora de molts projectes diferents enfocats a la cura del càncer. Arrel d'això sempre he volgut saber més d'aquest tema i ho he aconseguit amb aquest TdR .

La segona **motivació** va ser tot el món de la recerca biomèdica i del laboratori. Jo personalment no em veig en un futur dedicant-m'hi, com la meua mare; però si que volia saber i conèixer amb una experiència pròpia el que suposa treballar a un laboratori: com treballen, diferents metodologies, les diferents dificultats, el que t'aporta... Gràcies a diferents persones he tingut aquesta gran oportunitat de poder fer una petita estada en un laboratori, TargetsLab, per elaborar la part pràctica d'aquest TdR i així comprovar la meua hipòtesi, i com millor que amb un tema relacionat amb el càncer. Abans d'aquesta experiència m'imaginava la vida d'un laboratori molt diferent i m'ha sobtat el poc coneixement que tenia sobre aquest món i, de fet, ha canviat completament la idea que tenia des d'aleshores.

En tercer i últim lloc hi trobem l'interès que tinc per l'enginyeria biomèdica, el que actualment em crida més l'atenció com a grau universitari. Més endavant veuran que la primera part d'aquest treball, la creació d'un cultiu 3D, és enginyeria biomèdica pròpiament dit. A més, vaig tenir l'oportunitat d'anar al GREP, un grup de recerca d'enginyeria per poder fer la creació dels cultius. Gràcies a això he pogut parlar amb diferents enginyers biomèdics i veure en primera persona alguns dels seus projectes, les seves zones de treball...

Ajuntant les tres motivacions i interessos i gràcies a les oportunitats que m'han donat, he tingut la sort de poder realitzar aquest TdR.

Abans de res faré un petit **resum** del què és el meu treball:

El meu treball consisteix a comprovar com el cultiu en tres dimensions (3D) permet un enriquiment de la subpoblació de cèl·lules mare tumorals en comparació amb els cultius tradicionals en dues dimensions (2D). Els cultius en 3D permeten reflectir millor les condicions *in vivo* presents en el teixit mamari així com mantenir una subpoblació de cèl·lules conegudes com a cèl·lules mare tumorals. Aquestes BCSCs es consideren les responsables de la gran agressivitat i mal pronòstic del TNBC. Per això, he fet recerca sobre aquest subtipus de càncer de mama i el paper de les BCSCs així com he estudiat les diferències entre el cultiu en 2D i 3D, que he acabat de completar amb la part pràctica. Vaig realitzar la meua part pràctica entre els dos grups de recerca de la Universitat de Girona, TargetsLab i el GREP. Allà vaig aprendre com es fabriquen les estructures o bastides per dur a terme el cultiu en 3D (anomenades *scaffolds*) així com el cultiu de línies cel·lulars de càncer de mama. Vaig dissenyar i fabricar un *scaffold* per, posteriorment, cultivar-hi cèl·lules de càncer de mama triple negatiu. Aquestes van ser cultivades tant en un cultiu tradicional (2D) com en un cultiu 3D per avaluar l'enriquiment de la població de BCSCs mitjançant l'anàlisi de l'expressió gènica de tres gens àmpliament descrits com a marcadors d'aquesta subpoblació. L'objectiu final era observar si hi ha diferències entre el cultiu tradicional en 2D i 3D.

La **hipòtesi** serà la següent:

“ El desenvolupament de les cèl·lules mare triple negatiu (BCSC) és més eficaç en els cultius 3D que en els 2D ”

I els **objectius**, resumits:

- Crear un medi de cultiu 3D per utilitzar-lo en la experimentació
- Comprovar que els cultius 3D permeten reflectir millor les condicions *in vivo* presents en el teixit mamari així com mantenir una subpoblació de cèl·lules conegudes com a cèl·lules mare tumorals BCSC que els cultius tradicionals 2D.

El treball està organitzat en dos **apartats**. Comença amb una introducció teòrica on he fet recerca de diferents conceptes necessaris per la realització del treball. He utilitzat pàgines web d'internet, llibres de text i diferents articles publicats de diferents projectes que m'han proporcionat els membres del laboratori. Hi ha una primera part relacionada sobretot amb el càncer de mama: el càncer de mama (BCa), el càncer de mama triple

negatiu (TNBC) i les cèl·lules mare tumorals (CSC) específicament les cèl·lules mare tumorals en càncer de mama (BCSC). La segona part engloba conceptes relacionats amb els medis de cultiu cel·lulars i la seva formació: cultius 2D, cultius 3D i diferents tecnologies d'impressió 3D. En aquest apartat hi ha un petit incís on s'explica un concepte d'estadística que he necessitat per poder interpretar els diferents resultats obtinguts en la part pràctica. Així doncs, la part pràctica la vaig començar el 17 de juny fins a principis de juliol. En el grup de recerca GREP vaig fer creació de *Scaffolds*. La resta ho vaig fer al TargetsLab, juntament i amb l'ajuda de la Sònia Palomeras i l'Andreu Franquesa, membres del grup.

El grup de recerca TargetsLab està adscrit al Departament de Ciències Mèdiques de Facultat de Medicina de la Universitat de Girona i ubicat entre el Parc Científic i l'Hospital Dr. Josep Trueta. Està dirigit per la professora catedràtica Dra. Teresa Puig, dos professors contractats doctors, 2 Caps de Servei de l'Institut Català d'Oncologia (Cap de Servei d'Oncologia i Cap de Servei de Radioteràpia), 4 metges adjunts (2 oncòlegs i 2 patòlegs), la responsable del Banc de Tumors de l'Hospital Dr. Josep Trueta, 1 doctora en Relacions Públiques i Publicitat, 1 promotora de recerca, 6 investigadors predoctorals, 1 estudiant de màster i 2 estudiants de TFG. La investigació que duen a terme està centrada en la recerca de noves estratègies per combatre els càncers més agressius, com el de mama i pulmó. Actualment estan treballant molt amb aquesta novetat dels cultius en tres dimensions i tenen com a principal diana les BCSC

MARC TEÒRIC

1. CÀNCER DE MAMA

El càncer de mama (BCa) és una malaltia causada per un creixement incontrolat de cèl·lules en el teixit mamari, concretament a la glàndula mamària, que es genera mitjançant un procés anomenat cariocinesi. El fet que el tumor maligne s'origini en una glàndula (adenocarcinoma*) suposa una major complexitat a nivell cel·lular i molecular, fent del BCa una patologia* molt heterogènia⁽¹⁶⁾. La cariocinesi és un procés on a resultat de l'acumulació d'alteracions de diferents gens, per exemple els gens que dirigeixen la producció d'una proteïna que forma part del sistema que regula la divisió cel·lular; les cèl·lules afectades esdevenen anormals i creixen fora de control. Aquestes cèl·lules formen masses anomenades tumors primaris i poden crear-ne d'altres anomenats tumors metastàtics (Explicat en el punt 2.3)^(1,5,6).

El càncer de mama és el més comú entre el sexe femení. Cal mencionar que el BCa, tot i ser molt més incident en dones, no és exclusiu per aquest grup ja que també s'ha trobat en un percentatge molt petit en homes. Segons l' *Observatorio del Cáncer AECC*, el risc de patir el càncer és 1 de cada 8 dones. A Espanya el 2020 s'han registrat 33.875 nous casos i 6.770 morts per BCa. A Catalunya s'han reportat 5.407 casos nous (dels quals 520 pertanyen a la província de Girona) i 1.082 morts (125 pertanyen a la província de Girona)⁽²⁾. A dia d'avui, el BCa és el càncer amb major incidència mundial amb 2.3 milions de casos nous, no obstant això, si mirem l'índex de mortalitat a nivell mundial (aproximadament 685.000 morts) és considerat el cinquè càncer més mortal⁽¹⁷⁾.

En països desenvolupats la incidència del BCa està relacionat amb diferents factors de risc hormonal (edat retardada de la menopausa i del primer part, per un major ús d'anticonceptius, entre altres) així com diferents estils de vida (sedentarisme, obesitat i consum d'alcohol). Part d'aquest augment es deu també a l'ús de millors tècniques de diagnòstic i cribratge*, factor essencial en la detecció del càncer en els primers estadis per permetre un millor pronòstic i evitar tractaments invasius i agressius. Per aquest

motiu, països amb menys recursos presenten menor incidència però una major taxa de mortalitat⁽¹⁷⁾.

A nivell anatòmic, la mama consta de tres parts principals: els lòbuls o les glàndules productores de llet, els conductes o tubs que condueixen la llet fins el mugró i el teixit conjuntiu que envolta i sosté totes les parts de la mama. La majoria dels càncers de mama comencen als lòbuls (glàndules) o als conductes, creant adenocarcinoma com s'ha comentat anteriorment⁽¹⁾.

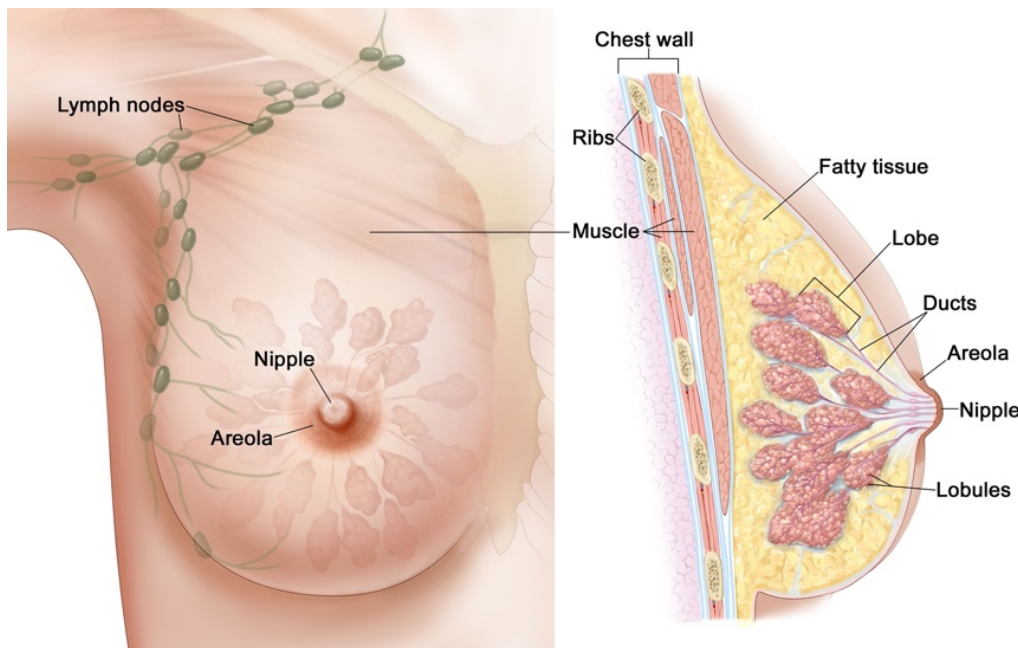


Figura 2.1.1. Anatomia de la mama femenina. Es mostra una imatge representativa de les diferents estructures mamaríes des del exterior i l'interior indicant les diferents parts principals. Podem localitzar-hi els lòbuls i els conductes on comencen els tumors (Extreta de la plana web del *National Cancer Institute*).

En els darrers anys, tècniques d'estudi han permès definir com a mínim quatre subtipus del BCa basat en els seu perfil molecular, mostrant el potencial per refinar la classificació del càncer de forma personalitzada a cada pacient. Aquest fet facilita l'avaluació del pronòstic i la predicció de la resposta les teràpies. No obstant això, també es basen en un ventall de factors clínics i tradicionals com la mida el tumor i característiques histològiques. Actualment s'agrupa en aquestes categories^(3,4,7):

- **Càncer de mama hormonal (ER+/PR+):** Aquesta variant sobre-expressa els receptors d'estrógen i progesterona, proteïnes que s'activen per les hormones d'estrógen i progesterona permeten la transcripció de gens específics. que

s'uneix a l'ADN i regula l'activitat de certs gens. Els tractaments bloquegen els efectes de l'estrogen o en redueixen els nivells.

- **HER2+:** Aquesta variant mostra una amplificació o sobre-expressió de la proteïna HER2. Aquesta proteïna és de la família de receptors de factors de creixement epidèrmic que quan s'activa promou la proliferació*, supervivència cel·lular i metàstasi. Representa un 20-30% dels casos de BCa. La seva teràpia es dirigeix contra el HER2 (anti-HER2)

Triple negatiu (TNBC) (explicat en el punt 2.2)

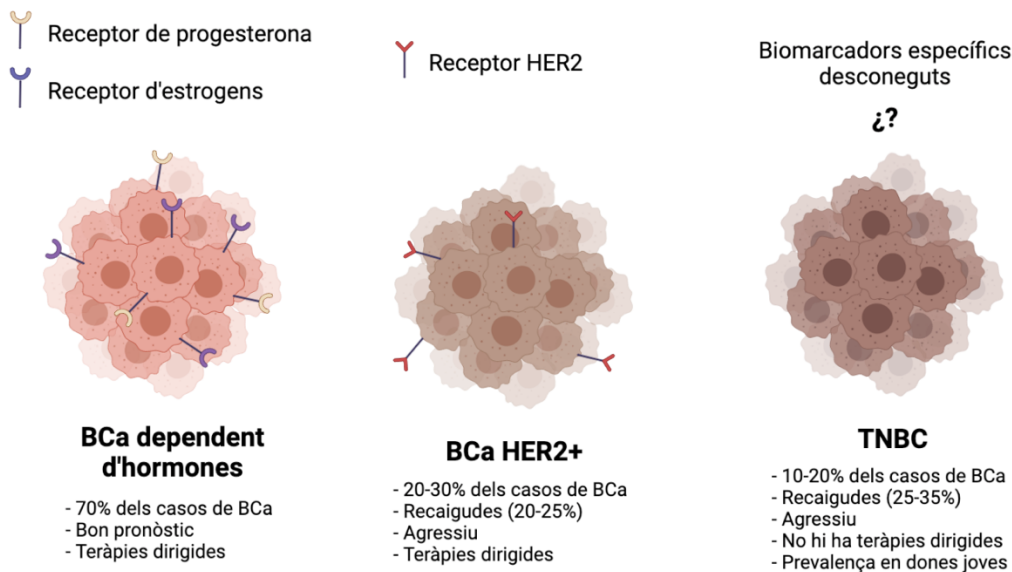


Figura 2.1.2. Classificació clínica del càncer de mama (dependents d'hormones, HER2+ i TNBC) i els seus trets més característics. Ens mostren els diferents receptors que tenen els tumors depenent del tipus (TFM-Pere Miquel, *TargetsLab*).

2. CÀNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIU (TNBC)

Aquesta variant no sobre-expressa receptors d'estrogen o de progesterona ni presenta amplificació o sobre-expressió d'HER2. Aquest fet suposa un desavantatge ja que no es poden utilitzar les teràpies específiques ja establertes per altres tipus de BCa (teràpia

Intracel·lular: dins la cèl·lula

Proliferació: Producció ràpida i repetida d'alguna cosa.

hormonal i anti-HER2). Per aquest motiu, el tractament es basa en la quimioteràpia (fàrmacs contra cèl·lules de creixement ràpid). Engloba un 10-20% dels càncers de mama. El seu gran interès oncològic és destacat per la falta de dianes específiques o de marcadors* ben identificats i l'alta heterogeneïtat molecular. A part de ser insensible a les teràpies contra els altres tipus de càncers de mama, és més agressiva i té una taxa de supervivència més curta.

Complementàriament, els últims anys s'ha assenyalat un conjunt de cèl·lules canceroses amb propietats de cèl·lula mare com a principals responsables de la invasivitat i recaigudes de les pacients amb TNBC. Aquesta població rep el nom de *Breast Cancer Stem Cells* (BCSC) i s'han trobat de forma més abundant en TNBC. Així doncs, tot i que el TNBC és inicialment sensible a la quimioteràpia, la gran probabilitat de recaigudes i l'aparició de resistències assenyalen la necessitat de millorar, així com de personalitzar les teràpies en funció del tipus de tumor^(16,18).

La següent gràfica mostra els diferents subtipus de TNBC a nivell molecular i els seus percentatges:

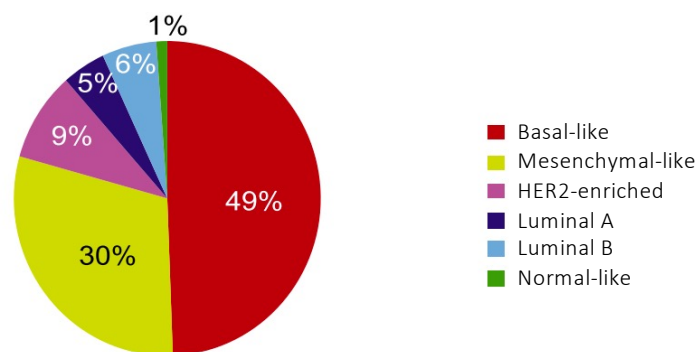


Figura 2.2.1 Percentatge de l'aparició dels diferents subtipus dels tumors del TNBC (Prat et al. 2011).

3. CÈL·LULES MARE TUMORALS (CSC)

Primerament ens situarem en el concepte de cèl·lula tumoral.

El creixement i la divisió de les cèl·lules del nostre organisme és realitzada per un procés anomenat mitosis. En aquest procés a partir d'una cèl·lula mare, se'n creen dues de filles (Omnis cellula e cellula). L'àcid desoxiribonucleic (ADN) de la primera cèl·lula es replica amb la finalitat d'obtenir dues cèl·lules amb el material genètic idèntic i repartit equitativament^(10,11).

Tot i haver-hi controls que s'encarreguen de l'eficàcia d'aquesta replicació i divisió, hi han casos on es produeixen diferents alteracions en l'ADN conegudes com a "mutacions". Una acumulació de manera progressiva de mutacions en una cèl·lula acabarà creant una cèl·lula tumoral. Aleshores, aquesta cèl·lula tindrà certes característiques i capacitats que podran ser perjudicials per l'ésser humà^(10,11). Aquestes característiques específiques de les cèl·lules tumorals són conegudes com els *hallmarks* del càncer i són les següents:

- La capacitat d'activar la seva divisió cel·lular sense la presència d'elements d'activació.
- Insensibilitat davant dels estímuls que podrien bloquejar el seu creixement com per exemple les pròpies cèl·lules del sistema immunitari*.
- La capacitat de dividir-se il·limitadament sense morir.
- La capacitat d'envair altres teixits gràcies a la seva capacitat de camuflar-se com si fossin un altre tipus de cèl·lula. Això ho aconsegueixen perdent les proteïnes que les classifiquen en el lloc d'on provenen. Utilitzen la mobilitat dels *fibroblasts*, cèl·lula del teixit connectiu, per desplaçar-se per els teixits (metàstasis).
- Creen nous vasos sanguinis per l'obtenció de nutrients i d'oxigen per el seu desenvolupament.
- La capacitat de reestructurar i adaptar el sistema d'obtenció d'energia per viure i poder funcionar en condicions "anormals"(Efecte Warburg).
- Es divideixen en excés contínuament sense control, superant la taxa de la naturalesa de la cèl·lula, formen tumors que envaeixen els teixits d'alguns òrgans creant un càncer⁽¹⁰⁾.

Sistema immunitari: protecció d'un organisme davant d'agents externs



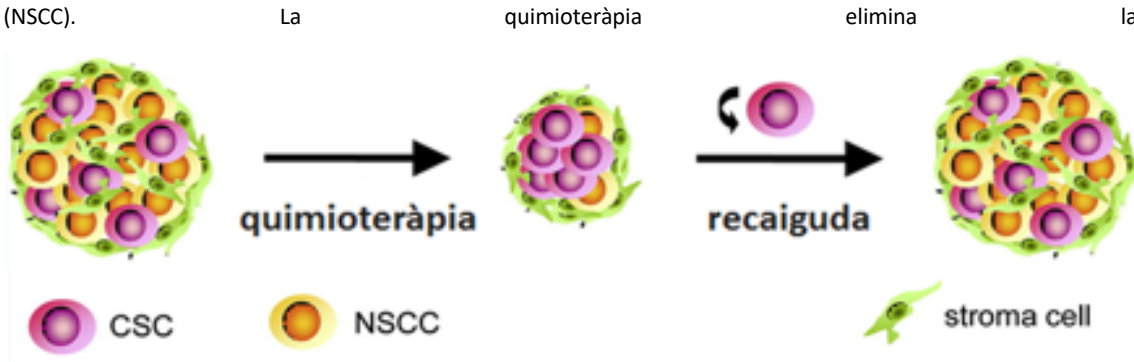
Figura 2.3.1 Representació de les 10 principals característiques de les cèl·lules tumorals descrites en el càncer (*Hallmarks*) (Hanahan D. et al. 2011).

Com hem dit anteriorment, una aglomeració d'aquestes cèl·lules crearia un massa tumoral conegut com a tumor primari . Aquest però, a través dels vasos sanguinis o la limfa, podria viatjar cap a altres teixits o òrgans fins aquell moment no afectats i crear més tumors, anomenats tumors secundaris. Aquest procés d'expansió tumoral és conegut com a metàstasi^(10,11,12).

En els últims anys s'han identificat una subpoblació de cèl·lules tumorals amb capacitats d'auto-renovació i diferenciació similars a les cèl·lules mare conegudes com a cèl·lules mare tumorals (**CSC o cancer stem cells**), les quals inicien i mantenen la progressió del tumor. A part d'aquesta la capacitat d'auto-renovar-se i, originar, mantenir i expandir els tumors (metàstasi); han demostrat ser més resistents als tractaments utilitzats en l'oncologia, principalment la quimioteràpia i la radioteràpia. És per aquest motiu que es considera les principals causants de les recaigudes en càncers.

En els últims anys, l'estudi d'aquesta subpoblació ha pres un paper rellevant en el camp de l'oncologia. Tractaments dirigits contra les cèl·lules mare tumorals podrien eliminar completament el tumor i acabar amb la malaltia. Per això es necessitaria desenvolupar una teràpia que conjuntament inclogui la quimioteràpia per eliminar el tumor i un segon medicament capaç d'eliminar les CSC^(13,14).

Figura 2.3.2. Esquema del paper de les BSCS en el càncer i el procés de recaiguda. Es veu un tumor primari amb una població cel·lular heterogènia, cèl·lules amb característiques stem-like (CSC) i cèl·lules canceroses no stem-like (NSCC).



majoria de les cèl·lules tumorals normals però no les CSC provoquen una futura diferenciació d'aquestes i un nou tumor (Modificada d'Esteller M et al. Molecular Oncology, 2012).

El tumor es presenta com una estructura organitzada heterogènia on es troben diferents poblacions cel·lulars, de les quals les CSC estan poc representades (1-3%) però, a través de divisions asimètriques permeten mantenir la seva pròpia població i diferenciar-se en qualsevol cèl·lula del tumor.

Centrant-nos en les cèl·lules mare tumorals del càncer de mama (**BCSCs o breast cancer stem cells**), diferents estudis han descobert que aquestes tenen característiques semblants a les cèl·lules mare mamàries; a més de la resistència a la radio- i quimioteràpia. Aquestes dues propietats afavoreixen al desenvolupament del tumor^(14, 15).

A més, s'ha observat una diferència en les propietats de les BCSC en funció del subtipus de TNBC. Alguns mostren una major abundància de BCSC amb característiques més epitelials (amb activació de l'enzim aldehid deshidrogenasa 1; **ALDH1**) o d'altres presenten una major proporció de BCSC més relacionats amb els enzims (**CD44+/CD24**)^(19,20).

Recurrència: Reparació dels símptomes d'una malaltia aparentment guarida, sense cap nou contacte patògen

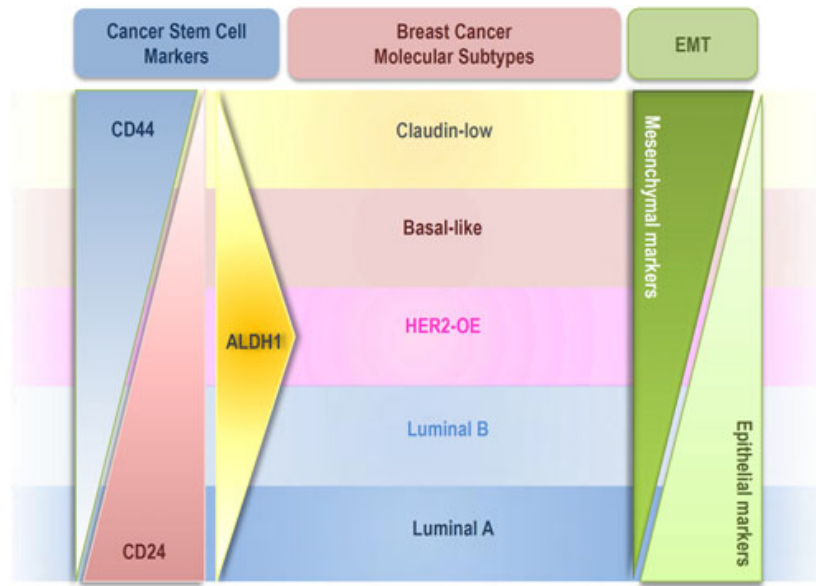


Figura 2.3.3 Representació de la relació entre els subtipus de TNBC i l'expressió dels biomarcadors CD24, CD44 i ALDH1 de les BSCS (Schmitt et al. 2012).

Aquestes cèl·lules són difícils de cultivar en cultius tradicionals (2D) ja que aquest tipus de cultiu indueix la seva diferenciació cel·lular i per tant no manté la capacitat de cèl·lules mare que els hi dona el seu potencial (perquè no poden simular correctament el seu ambient *in vivo*). Per això la utilització de cultius 3D ha permès un entorn més fisiològic i natural a la cèl·lula, mantenint les cèl·lules amb característiques *stem* i conseqüentment permet un enriquiment del creixement i desenvolupament d'aquesta població en comparació als 2D.

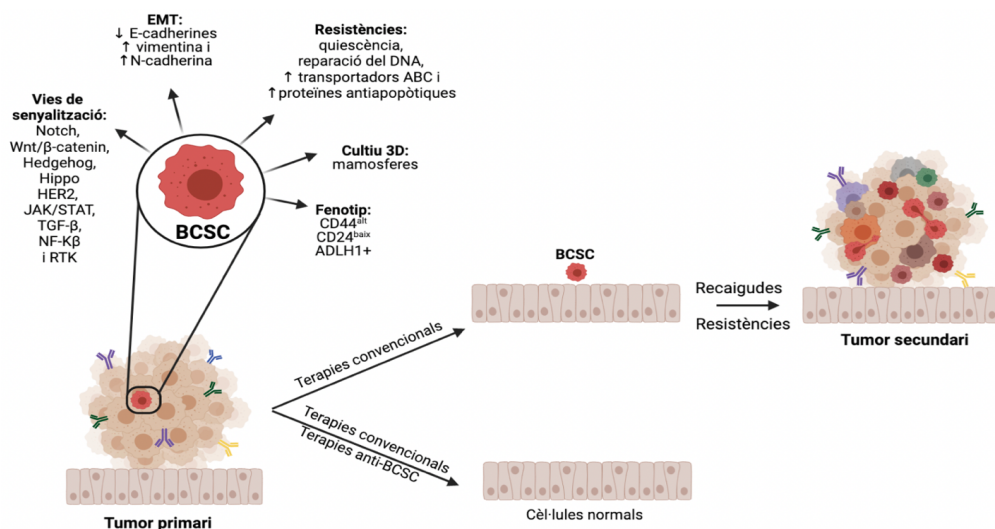


Figura 2.3.4 Representació esquemàtica de les característiques de les BCSC i del seu potencial per causar recaigudes i resistències als tractaments convencionals (TFM de Pere Miquel, *TargetsLab*).

4. CULTIUS CEL·LULARS 2D

Durant les últimes dècades, el cultiu cel·lular *in vitro** ha esdevingut una eina essencial en l'àmbit de recerca biològica cel·lular. A finals del segle 19 els científics van començar a fer els primers intents per mantenir vius teixits o cèl·lules després de la mort del pacient⁽²¹⁾. Alguns anys després, l'establiment de la primera línia cel·lular immortal el 1951, les cèl·lules *HeLa*, van iniciar l'ús de cultius cel·lulars *in vitro*. Aleshores va haver-hi una necessitat urgent per el desenvolupament d'un protocol de manteniment de les cèl·lules i així, poder estudiar el seu comportament *ex vivo*.

En els primers intents descrits les cèl·lules es van cultivar en superfícies planes fetes de vidre i recobertes de col·lagen i altres proteïnes per afavorir l'adhesió cel·lular⁽²²⁾. Tot i la seva aplicabilitat, els investigadors van començar a utilitzar dipòsits plàstics d'un sol ús gràcies a la seva facilitat d'ús i practicabilitat (plaques de Petri). El poliestirè ha estat al polímer més utilitzat per fabricar-los gràcies a la seva claredat òptica, la bona capacitat de modelatge i possibilitat de ser tractats per adaptar les seves característiques hidròfiles⁽²⁴⁾. Tot i la seva àmplia utilització arreu del món, aquest tipus de cultiu només permet el creixement i expansió cel·lular en monocapa. Les cèl·lules cultivades en aquests medis adopten una morfologia* plana que difereix del seu patró real *in vivo**. En condicions fisiològiques, és a dir, en el nostre organisme les cèl·lules es troben disposades en una xarxa de proteïnes fibroses i molècules (matriu extracel·lular, ECM) que tenen un paper important en la regulació de la cèl·lula⁽²⁵⁾. El cultiu 2D modifica directament els receptors de membrana i l'estructura del citoesquelet, afectant l'expressió gènica i la regulació de la síntesi proteïnes⁽²⁶⁾. S'ha comprovat que aquestes diferències son un fet clau que influeix en la població de les CSC, les quals perden certes propietats i es diferencien perdent així el seu fenotip de cèl·lula mare⁽²⁷⁾.

A part de la seva superfície plana, la seva rigidesa també és un factor que canvia l'estat fisiològic *in vivo* de la cèl·lula. Les cèl·lules mamíferes es troben en superfícies toves com

Morfologia: la forma i l'estructura dels éssers vius

In vivo: 'en (l'organisme) viu'.

In vitro: 'en un medi artificial', 'en el laboratori' (fecundació externa)

l'ECM o a altres cèl·lules similars a elles, diferents doncs a la rigidesa d'aquestes plaques. Això altera el seu estat morfològic, de proliferació, d'expressió, de propagació⁽²⁸⁾, etc.

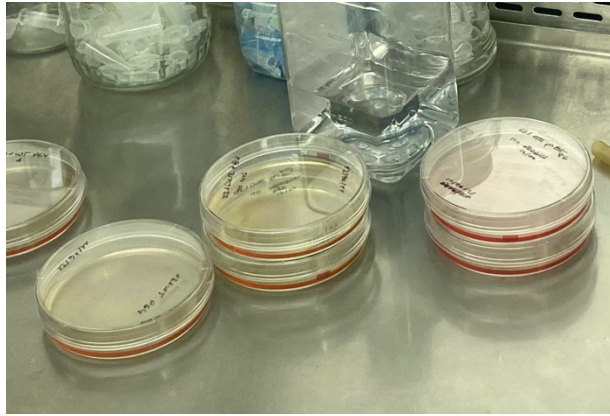


Figura 2.4.1 Plaques de Petri convencionals (2D). S'observa l'estructura circular, el medi vermell on creixen les cèl·lules, les anotacions a les plaques per saber què hi ha cultivat, entre altres (Font pròpia).

5. CULTIUS CEL·LULARS 3D

A causa dels inconvenients del cultiu cel·lular 2D exposat a l'apartat anterior els investigadors van començar a intentar desenvolupar un nou mètode de cultiu que més similar al microambient *in vivo* i, per tant, en 3D de les cèl·lules i teixits. Primerament, es va descobrir que les cèl·lules neuronals podien créixer en superfícies no adherents (contrari a les plaques de Petri). Les cèl·lules que van sobreviure van mostrar una morfologia arrodonida i van proliferar formant unes petites esferes formades per cèl·lules neuronals mare multipotents* no diferenciades^(29,30). Des d'aquest descobriment el cultiu en esferes ha sigut un bon mètode per quantificar l'activitat de les cèl·lules mare en molts càncers diferents, incloent el càncer de mama⁽³¹⁾. Tot i així la morfologia de les cèl·lules no imita la forma de les cèl·lules *in vivo* i algunes cèl·lules canceroses no formen esferes compactes sinó que s'uneixen lliurement a altres cèl·lules. Per aquest motiu, posteriorment, s'ha intentat desenvolupar unes estructures més similars a la ECM, la matriu extracel·lular. El 1960, Wichterle i Lim van desenvolupar una matriu composta d'una xarxa transversal i encreuada de *polyhydroxyethylmethacrylate* (pHEMA), amb alta afinitat amb l'aigua. Aquesta construcció biocompatible* va ser designada com a **hidrogel**⁽³²⁾. Posteriorment aquest prototip inicial va ser modificat per ser utilitzat per cultius cel·lulars en 3D. Actualment els hidrogels estan creats amb

materials biològics com agarosa, fibrina, col·lagen, àcid hialurònic i un alt contingut d'aigua . Aquesta estructura hidratada fa que sigui més similar a l'ECM⁽³³⁾. Tot i els seus beneficis, els hidrogels també mostren algunes limitacions com per exemple la difusió d'oxigen i nutrients.

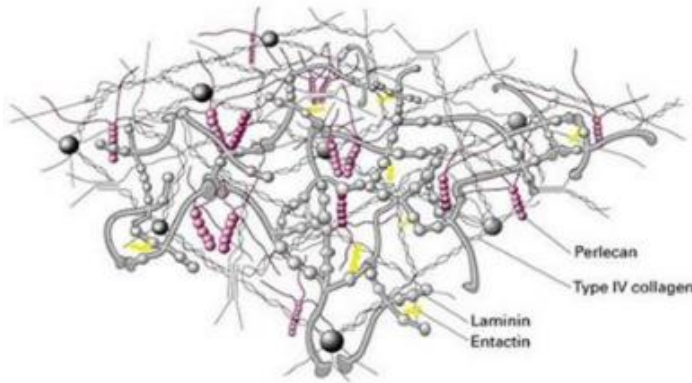


Figura 2.5.1 Representació esquematitzada de la matriu extracel·lular i els seus components principals (Extreta de la plana web: www.uv.es/~knockin/perlecan.html).

Finalment els *scaffolds* han sortit com un altre suport de cultiu cel·lular en 3D per corregir i superar tots els inconvenients dels mètodes anteriors. Aquests presenten una xarxa composta de filaments polimèrics que simulen l'estructura filamentosa de l'ECM. Aquest entorn permet que les cèl·lules s'adhereixin tant a altres cèl·lules com a les fibres.

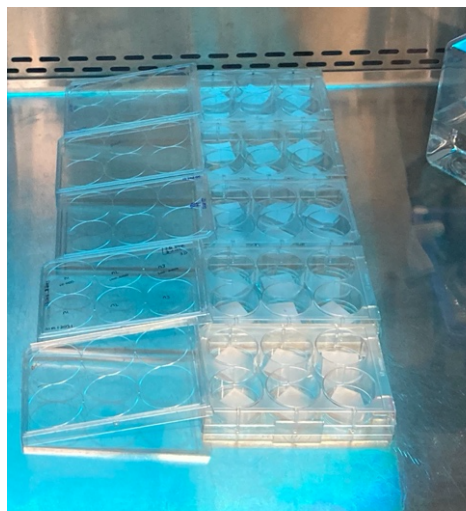


Figura 2.5.2 Cultiu 3D, plaques amb *scaffolds* de 6 pous. S'observen els sis pous amb les bastides blanques situades al centre (*scaffolds*) (Font pròpia).

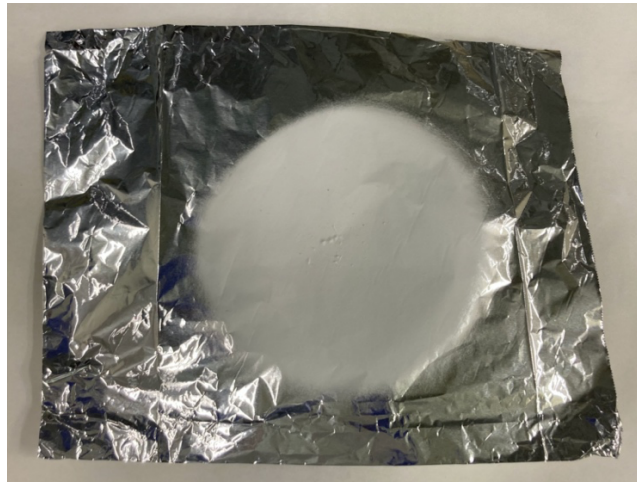
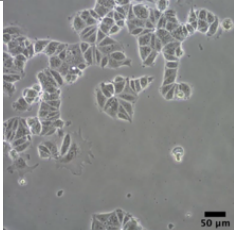
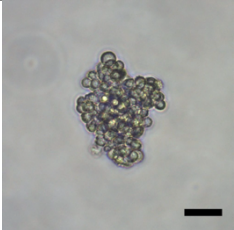
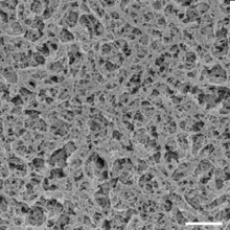
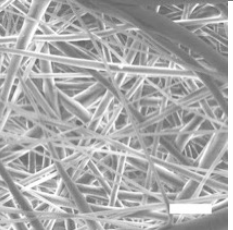


Figura 2.5.3 Scaffold imprès amb màquina FFF abans de ser tallat (Font pròpia).

6. COMPARACIONS CULTIU 2D vs 3D

Taula 1. Comparació dels diferents medis de cultiu (Traduït de Rabionet et al. 2019).

	2D	3D		
	Monolayer	Spheres	Hydrogels	Scaffolds
				
	MCF-7 cèl·lules en cultiu tradicional (Placa de Petri)	MDA-MB-468 esfera cel·lular (barra d'escala= 50 µm)	Microscopi electrònic d'escaneig de Matrigel (barra d'escala= 1 µm)	Microscopi electrònic d'escaneig de bastida (<i>scaffold</i>) de PCL amb electrospinning (scale bar = 10 µm)
Composició	Superfícies planes adherents de poliestiré	Cultiu en suspensió en superfícies no-adherents	Material biològic (aigua, agarosa, fibrina, col·lagen, àcid hialurònic)	Polímers biocompatibles

Morfologia cel·lular	Plana	Esfèrica formant agrupacions en suspensió	Allargades	Allargades
	Ràpida i barata	Cultiu 3D fàcil de dur a terme	Imiten l'estructura ECM	Imiten l'estructura ECM
Avantatges		Útil per quantificar l'activitat de les cèl·lules mare i crear un fàrmac contra el càncer	Contenen proteïnes i factors de creixament de l'ECM	Proteïnes de l'ECM poden ser afegides
				Enriqueixen la subpoblació de CSC
Desavantatges	L'ambient és diferent al del estat fisiològic	Les cèl·lules esfèriques no imiten la morfologia <i>in vivo</i>	Mala difusió de nutrients	Diferents línies cel·lulars necessiten una arquitectura diferent d' <i>scaffolds</i>
	Cèl·lules d'una sola capa són menys agresives que les reals, <i>in vivo</i>	Algunes cèl·lules no formen l'estructura esfèrica però s'uneixen a altres agrupacions de cèl·lules	Composició inaccurada	Es necessita la tripsinització
	Cultius 2D fan que les cèl·lules mare es diferenciïn			

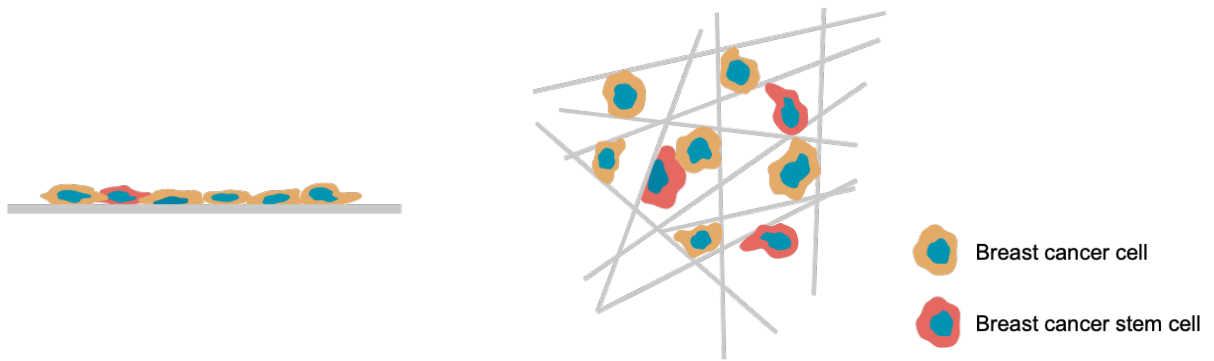


Figura 2.6.1 Comparació esquemàtica de la distribució cel·lular en un cultiu de cèl·lules de BCa en 2D i 3D (Rabionet et al. 2019).

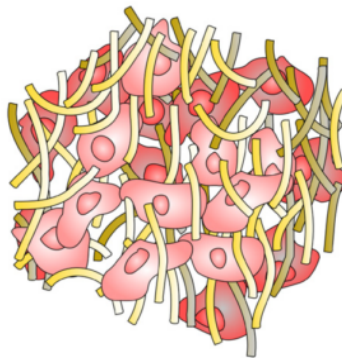


Figura 2.6.2 Cultiu en hidrogel. Les cèl·lules es troben immerses en una matriu de proteïnes en un gel aquós (Knight et al. J. Anat. 2014).

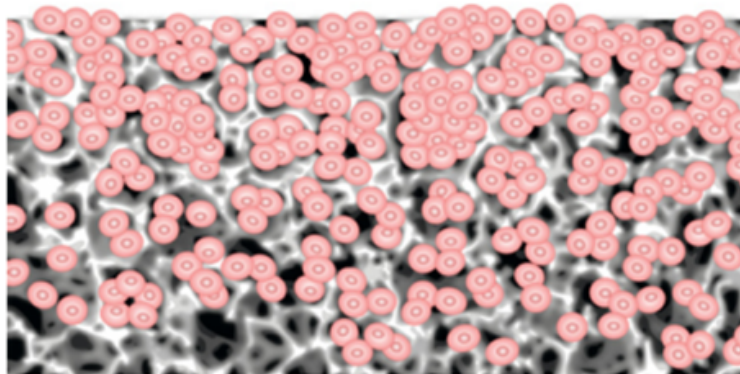


Figura 2.6.3 Cultiu en *scaffolds* (Knight et al. J. Anat. 2014).

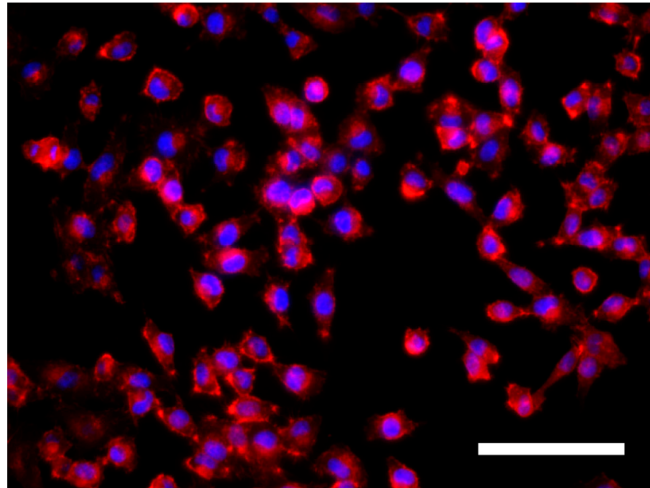


Figura 2.6.4 Cèl·lules cultivades en medi de cultiu 2D (Font pròpia).

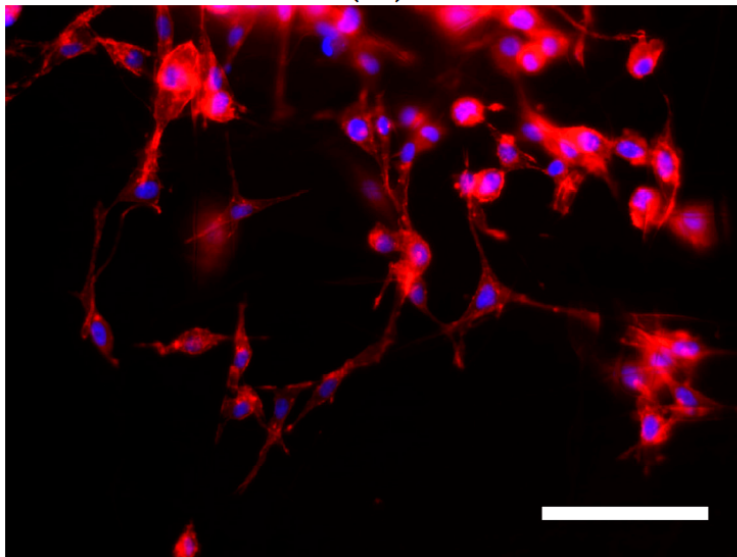


Figura 2.6.5 Cèl·lules cultivades en medi de cultiu 3D (Font pròpia).

7. TECNOLOGIES D'IMPRESSIÓ 3D

Hi ha diverses tecnologies per la fabricació dels *scaffolds*:

-Fused filament fabrication (FFF) o fabricació de filaments fusionats: és una tecnologia de fabricació additiva (AM) utilitzada per les impressores 3D. Es desfà un polímer i es deposita en capes successives fins que imprimeix l'estructura final prèviament dissenyada. A causa de les seves característiques tècniques les fibres micromètriques es poden fabricar fàcilment, però la producció de filaments més petits causa més complicacions. La tècnica FFF permet als investigadors dissenyar i personalitzar el teixit intern així com el patró extern depenent del teixit que es vol generar, per això, els *scaffolds* poden ser adaptats a cada pacient. Determinar els paràmetres òptims per al

procés no deixa de ser una tasca obligatòria i crítica^(34,35). En aquest procediment els paràmetres estan relacionats amb el polímer utilitzat i la finalitat del *scaffold*. A més, s'han d'estudiar moltes altres característiques com la porositat, la mida dels porus, la forma dels porus, entre altres, per aconseguir un suport cel·lular útil⁽³⁶⁾. Les impressores 3D que utilitzen FFF son una de les millors opcions per la construcció d'aquestes estructures ja que son màquines assequibles per el preu i fàcilment millorables per aconseguir millor qualitat de impressió.

- **Electrospinning (ES)**: Amb aquesta tècnica el polímer és dissolt i col·locat en una xeringa connectada en una agulla mecànica. S'aplica un alt voltatge perquè el polímer líquid formi el Taylor Cone, una "gota" amb una forma de con, quan surti de l'agulla. Quan la força elèctrica supera la tensió superficial, del Taylor s'expulsa una corrent de líquid que va des de l'agulla fins al col·lector del terra mentre el solvent s'evapora. Aleshores fibres de polímer es formen i dipositen, aleatòriament, en el col·lector. Aquesta tecnologia ens permet produir fibres de diàmetre molt petit, semblants al diàmetre del col·lagen, principal component del ECM⁽³⁷⁾. Igual que en la tècnica FFF, tenen una gran influència els paràmetres utilitzats, que en aquest cas son: la concentració del polímer, el solvent, el voltatge, el *flowrate* (rapidesa amb la que surt el polímer)...

Totes les cèl·lules tenen característiques morfològiques diferents les quals ens portaran a fer diferents suports depenent del que requereixin. Aquests trets específics determinaran la tecnologia i el polímer utilitzat, igual que les característiques de l'estructura. Un dels polímers més utilitzat és el poly(ϵ -caprolactone) o PCL, biodegradable i bio-compatible. Aquest plàstic té una taxa de degradació lenta i un punt de fusió baix de 60°C. A més, es pot utilitzar en diverses tecnologies i dissoldre en diferents solvents com la acetona i el benzè⁽³⁸⁾. En aquests *scaffolds* també es pot afegir components del ECM que actuen com a agents bioquímics com col·lagen i proteoglicans.

Taula 2.6.1 Taula dels dos principals mètodes d'impressió 3D (TFM Marc Rabionet, TargetsLab 2020)

	Fused Filament Fabrication	Electrospinning
Esquema	<p>Bobina de material polimèric</p> <p>L'extrusor pressiona el filament</p> <p>Un bloc escalfador fon el filament a una determinada temperatura</p> <p>El filament escalfat és forçat a sortir amb un menor diàmetre</p> <p>L'extrusor i/o la superfície d'impressió es mouen en els tres eixos per dipositar el material</p>	<p>Solució polimèrica</p> <p>Xeringa ⊕</p> <p>Alt voltatge</p> <p>Superfície d'impressió</p>
Màquina	<p>RepRap BCN3D+ impressora de BCN3D tecnologies (Barcelona, Espanya)</p>	<p>Electrospinning Spraybase® (Dublin, Ireland)</p>

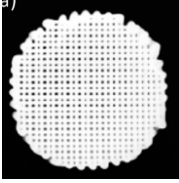

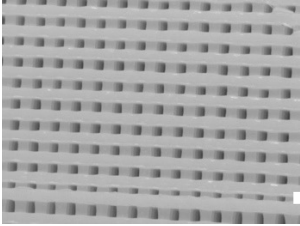
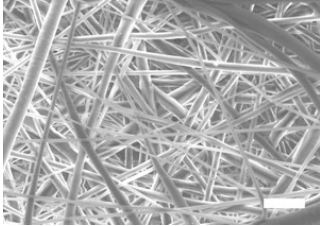
Scaffolds creats	Visió macroscòpica		
		PCL scaffold creat per una impressora 3D	PCL scaffold creat per una màquina d'electrospinning
	Visió microscòpica		
		Fotografia microscòpica dun scaffold FFF I PCL (escala: 4 mm)	Fotografia amb microscòpi electrònic d'un scaffold ES I PCL (escala: 10 µm)



Figura 2.6.1 Xeringa i màquina FFF (Font pròpia).

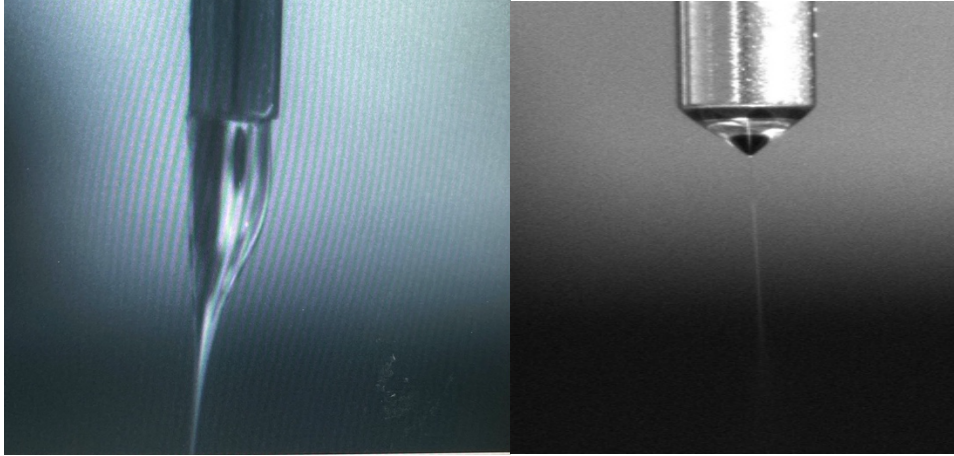


Figura 2.6.2 Formació del Taylor Cone. Aquestes imatges són la reproducció de la gravació de la sortida del PCL per l'agulla (tècnica FFF) a l'ordinador per on es controla la formació del Taylor Cone durant la impressió del *scaffold* (Font pròpia).

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Les teràpies actuals contra el càncer de mama triple negatiu (TNBC) són incapaces d'evitar la recurrència del tumor i la metàstasis, en part degut a que no eliminen les *Breast Cancer Stem Cells* (BCSC). S'ha vist que amb els cultius tradicionals (coneguts com a cultius cel·lulars 2D) no mimetitzen correctament l'ambient tumoral, és a dir, la matriu extracel·lular on creixen aquestes cèl·lules en l'organisme humà, causant diverses modificacions morfològiques i fisiològiques a la cèl·lula. Una d'aquestes característiques modificades és la diferenciació de les cèl·lules mare tumorals, dificultant així la seva caracterització i estudi. Aquests darrers anys s'han desenvolupat nous mètodes de cultiu en 3D, aconseguint mimetitzar millor l'ambient *in vivo* de les cèl·lules, entre els quals torbem el cultiu 3D mitjançant *scaffolds*. Per aquest motiu la **hipòtesi** que presento en aquest treball és la següent:

- “ El desenvolupament de les cèl·lules mare triple negatiu (BCSC) és més eficaç en els cultius 3D que en els 2D ”

Per poder comprovar aquesta hipòtesi hauré de seguir tres grans **objectius** dividits en objectius secundaris :

1.- Imprimir mitjançant impressora 3D els *scaffolds*

- 1.1.- Preparar los solució de PCL 15%
- 1.2.- Imprimir els *scaffolds* mitjançant electrospinning
- 1.3.- Tallar els *scaffolds*
- 1.4.- Esterilitzar els *scaffolds*

2.- Comparar la proliferació cel·lular de la línia cel·lular de BCa TN (MDA-MB-468) en cultiu 2D vs. 3D mitjançant estudi de viabilitat cel·lular (MTT)

3.- Anàlisi de l'expressió gènica dels gens ALDH1, CD44 i CD24 per poder determinar l'enriquiment o no de la subpoblació de BCSCs

3.1.- Extracció RNA

3.2.- Retro transcripció (cDNA)

3.3.- Anàlisi de l'expressió gènica per *real-time PCR* (RTPCR)

METODOLOGIA

1. Fabricació de l'*scaffold*

Per la fabricació del *scaffold* he utilitzat el material Polyε-caprolactone (PCL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), degut a la seva biocompatibilitat i lenta cinètica de degradació. Aquest es dissol en acetona a una concentració de 15% PCL (15gr de PCL en 100mL d'acetona). He fet servir la tècnica FFF (*Fused Filament Fabrication*) amb la màquina d'electrospinning Spraybase (Dublin, Ireland) .

La solució de PCL s'introdueix en una xeringa col·locada en un premador Syringe Pump Pro software (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA) que controla el *flow rate* (velocitat en la que és expulsat el PCL), que serà de 6mL/h . El voltatge estàndard era de 7.65 kV tot i que podia anar variant depenent de com es formés el *Taylor Cone* i el filament. Per cada *scaffold* es necessiten 5mL de de la solució, el programa para de premar la xeringa quan ja s'han expulsat 5mL. Col·loquem l'agulla per on surt el filament a 15cm de la base. A la base hi posem un paper d'alumini per dues raons: per tenir una base on formar el *scaffold* i per evitar que per forces electromagnètiques els filaments es concentrin a prop dels claus de metall de la base. S'inicia el programa a l'ordinador i s'espera uns 50' que has d'anar comprovant el filament, netejant l'agulla i evitant que es facin boles de PCL al *scaffold*.



Figura 1.1. Xeringa col·locada en el premador connectada en un petit conducte que transporta el PCL fins a dintre la cabina on surt per l'agulla. El premador va dirigit per un programa que li indica la velocitat i forma amb la que ha de premar perquè, en aquest cas, expulsi 5mL a 6mL/h (Font pròpia).

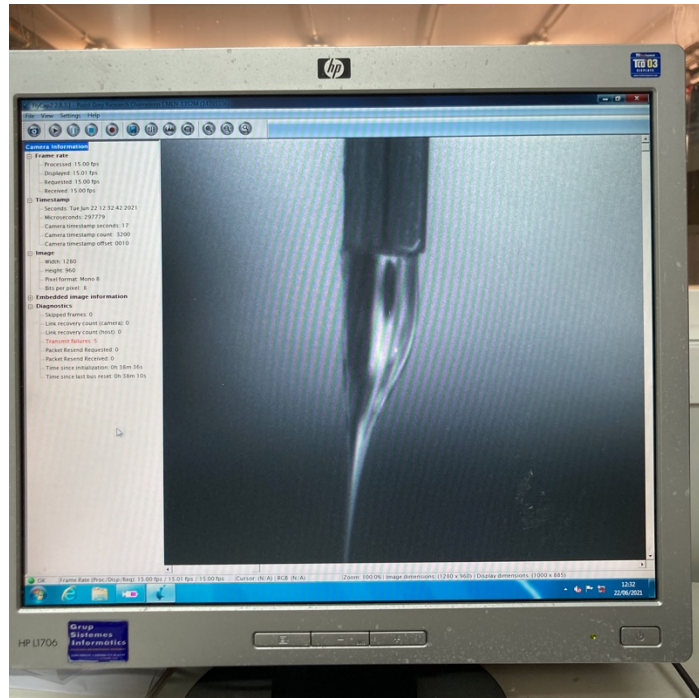


Figura 1.2 Ordinador amb el qual s'inicia el programa. Es veu un vídeo de l'agulla i la sortida del PCL amb el que controlem el filament i el *Taylor Cone* (Font pròpia).

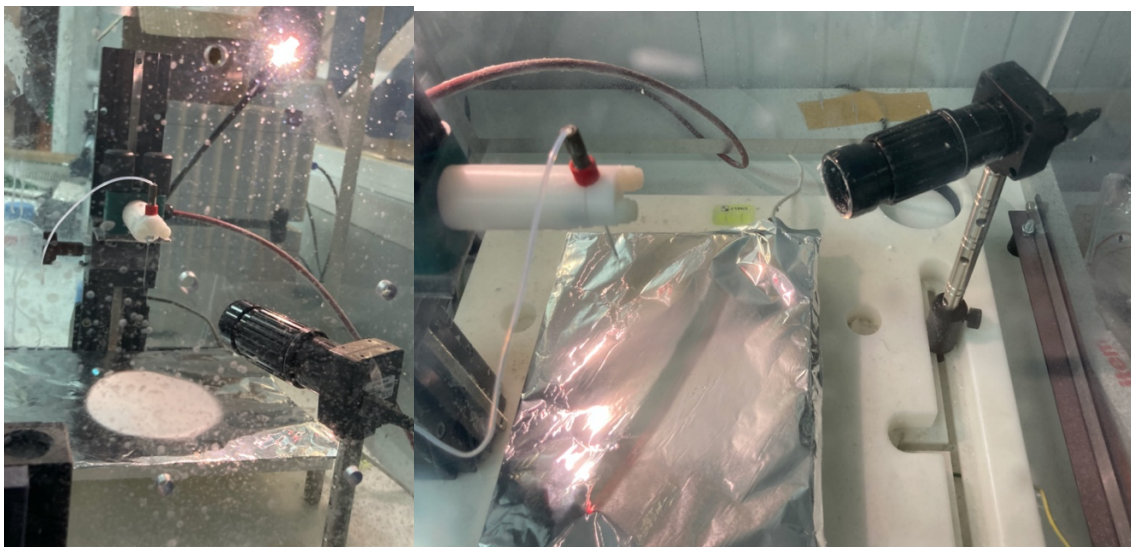


Figura 1.3 Elements dins la càpsula: a la dreta es pot observar la càmera amb la qual controlem la sortida del fus i la formació del *Taylor Cone*. S'observa també la formació i posició del *scaffold* sobre el paper d'alumini, i, l'agulla està connectada al conducte per on surt el líquid. Aquesta està en un voltatge de 7'65kv (Font pròpia).

Un cop tenim el *scaffold* imprès sobre l'alumini l'hem de tallar de manera que càpiga en una placa de 6 pous i separar de l'alumini. Agafem un paper gran i hi fem una quadrícula que servirà com a mida dels *scaffolds*. Els quadrats els dibuixarem de 2'5cm per plaques

de 6 pous. Un cop tallat el *scaffold* amb un bisturí, amb l'ajuda de les pinces ho separarem de l'alumini i ho guardarem per més endavant desinfectar-los i cultivar-los.

Esterilització dels *scaffolds*, cultiu 3D: El dia abans deixes a l'incubador una placa de 6 pous amb un *scaffold* cada un amb etanol al 70%. Aspires el metanol i neteges amb 2mL de PBS i aspiras, repetint-ho dues vegades. Canvies els *scaffolds* de placa, que no tingui la base adherent. Aleshores deixes les plaques obertes amb rajos ultraviolats 30'.

2. Cultiu cel·lular

Utilitzes cèl·lules TNBC (triple-negative breast cancer) 468 WT (MDA-MB-468 wt; *European Collection of Authenticated Cell Cultures* [ECACC], 2017; *American Type Culture Collection*[®] (ATCC; Manssas, Virginia). Els cultius cel·lulars s'han mantingut a l'incubador a 37°C amb el 95% d'aire i el 5% de CO₂.

1- Pas cel·lular:

Agafes les plaques de Petri de 100mm de diàmetre (Sarstedt[®]; Newton, NC, EUA) amb medi (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Lonza[®]Basilea, Suïssa) i cèl·lules. Aspires el medi amb una pipeta sense tocar la base de la placa. Es neteja dues vegades amb 3mL de tampó fosfat salí PBS (Gibco, Paisley, United Kingdom). Aleshores afegeixes 3mL de Tripsina per separar les cèl·lules de la monocapa adherent de la placa i ho guardes 10' a l'incubador (37°C, 5% CO₂). Mires amb el microscopi que les cèl·lules estiguin desenganxades i neutralitza la tripsina amb 7mL de DMEM utilitzant la tècnica de *flushing*. Es col·loca en un tub Falcon i es centrifuga a 1500rpm 5'. Aleshores aconseguim que les cèl·lules (més denses) precipitin al final del tub formant el que es coneix com pellet cel·lular. Seguidament farem el recompte i les cultivarem en els medis 2D i 3D.

2- Recompte cel·lular i preparació de la sembra:

Agafes el *falcon* centrifugat amb el pellet cel·lular. Aspires el medi i resuspens el pellet cel·lular amb medi nou i fresc (2mL. Per fer el recompte cel·lular (cèl·lules/mL) utilitzarem la cambra de Neubauer i la tinció cel·lular blau de tripa, *trip and blue*^{*}. En un

Eichman posarem 50 µL de *trip and blue* i 10 µL de cèl·lules (5:1) . Posem la solució a la Neubauer i seguint la pauta contem les cèl·lules dels 4 quadrants diferents de la Neubauer amb el microscopi òptic invertit. Calculem: una mitjana dels 4 resultats, ho multipliquem per 5 (la dissolució és de 1 a 5) i per 10.000 per passar de µL a mL.

El número de cèl·lules s'ha calculat tenint en compte la dissolució feta amb el blau de tripa (FD) i el volum utilitzat per resuspendre el pellet (V) – (1:5)

Per exemple: $(75+71+99+167 / 4) \times 5 \times 10.000 = 3.900.000$ cells/mL

Estudis previs han determinat en número de cèl·lules necessàries a cada pou per l'estudi a realitzar. En el nostre cas, amb la línia MDA-MB-468 necessitem 525.000 cèl·lules per pou en 2D (6 pous) i 975.000 cèl·lules per pou en el 3D (12 pous) . Calculem doncs quants µL necessitem de la "solució mare".

Aleshores s'afegeix el medi DMEM i els µL de cèl·lules en les plaques 2D amb un total de 2mL per pou. En el cas dels *scaffolds* , dipositem una quantitat inferior de medi amb cèl·lules (100 µL) per ajudar a que aquestes quedin adherides a l'estructura. Al cap de tres hores, acabem d'afegir medi fins als 2mL (volum e medi requerit perquè les cèl·lules tinguin els nutrients necessaris). Es guarden 72hores a l'incubador.

(Les cèl·lules sobrants les tornem en una placa de Petri amb 8mL de DMEM i les deixem a la incubadora per posteriors estudis).

**trip and blue*: Líquid blau utilitzat per poder identificar les cèl·lules mortes i vives, tenint doncs les mortes perquè s'observin només les vives i es puguin contar.



Figura 2.1 Plaques de cultiu a la incubadora (Font pròpia).



Figura 2.2 Procés de neutralització de la tripsina. Veiem l'expulsió de medi DMEM per sobre la placa (Font pròpia).



Figura 2.3 Recompte cel·lular amb la tècnica Neubauer. S'observa la Neubauer, la solució de *trip and blue* amb cèl·lules sota un petit mirall i col·locat al microscopi (Font pròpia).



Figura 2.4 Placa de 6 pous amb cultiu cel·lular 3D amb cèl·lules MDA-MB-468 WT (Font pròpia).

Al cap de dos-tres dies agafes les plaques sembrades de l'incubador. Aspires el medi i rentes dues vegades amb el PBS. En el cas dels *scaffolds* els canvies de placa per tal de no recollir les cèl·lules adherides al fons del pou. Afegeixes 2mL de tripsina per pou i fas tècnica *up and down*. La tripsina és un enzim que permet desenganxar les cèl·lules de la superfície. Esperes 10' amb les plaques 2D i 25' amb les plaques de 3D amb la tripsina actuant a l'incubador. Una vegada aixecades les cèl·lules, es necessita neutralitzar el seu efecte que podria ser perjudicial per les cèl·lules. Per fer-ho, afegim medi de cultiu cel·lular ja que porta diferents components que aturen l'efecte de la tripsina. Ho reculls en una pipeta Falcon de 50 i ho centrifugues a 1500rpm 5'. Aleshores aspiras al medi sense tocar el pellet de cèl·lules i afegeixes 1mL de PBS fred, és a dir, fas un rentat de les

cèl·lules. Posa la mostra a centrifugar a 4^o 1200rpm 5' fins obtenir un nou pellet cel·lular. Finalment aspiras amb una agulla prima i ho guardes a -80^o.

3. Proliferació cel·lular MTT

Per avaluar primer si les cèl·lules creixen en els dos tipus de cultiu cel·lular a estudiar (2D vs. 3D) realitzem un estudi de proliferació. Aquest procés consisteix en sembrar el mateix número de cèl·lules en un cultiu i l'altre i veure, al cap de 72h, si s'han dividit o no.

Per fer-ho, una vegada sembrades les cèl·lules seguint el protocol anteriorment explicat, els *scaffolds* es renten amb PBS i es canvien a una nova placa per evitar tenir en compte les cèl·lules adherides al fons del pou i no a l'*scaffold*. En el cas del cultiu 2D, no es produeix cap canvi. En ambdós tipus de cultiu procedim a afegir el reactiu de MTT (bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli). MTT és un compost de color groc que, en presència d'enzims reductors de les cèl·lules, és reduït i pren un color lila intens. Per tant, la conversió de color s'empra com a mesura de viabilitat cel·lular. El protocol a seguir és incubar les cèl·lules amb 1mL de medi i 100 µL de MTT (Sigma-Aldrich 10%) durant 2 h i 30'. Els cristalls liles que es formen es van dissoldre amb 1mL de DMSO. 4 vegades 100 µL d'aquesta solució son envasats en una placa de 96 pous i col·locats en un lector de plaques que és un espectrofotòmetre que mesura la intensitat del color (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

4. Extracció RNA

Resumidament, per l'extracció del RNA primerament les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van re-suspendre en 1mL de Quiazol (Qiagen, Hilden, Germany). Vam utilitzar el kit **GeneJET RNA Purification Kit** ⁽³⁹⁾ (ThermoFisher Scientific Inc.) per aïllar el RNA seguint les instruccions dels fabricant. El RNA va ser estudiat i quantificat amb un Nano-Drop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

El Kit proporciona tot el material (menys les eines de laboratori i substàncies comunes en els laboratoris) i ens indica clarament el protocol:

Primerament afegirem 1mL de Quiazol al pellet i deixem actuar 5'. El Quiazol és un agent de lisi cel·lular, és a dir, permet trencar la membrana i alliberar el seu contingut on hi ha

les àcids nucleics. Aleshores pipetegem i agafem tot el líquid i el guardem a un microtub (*eppendorf*) a -80°C per començar el protocol de purificació.

Afegim $200\ \mu\text{L}$ de cloroform per cada mL de Quiazol. Agitem a temperatura ambient 2-3' i ho centrifuguem a 12000G a 4°C 15'. Veiem que en el microtub (*eppendorf*) s'hauran format tres capes diferents: la fase transparent on hi ha el que hem de recollir (material genètic), la segona on hi ha els greixos i la última on hi ha els restes de les cèl·lules. Amb aquests procediments hem aconseguit trencar les membranes i separar el material genètic de les cèl·lules Aleshores afegim, del mateix volum que tenim, etanol del 70%. Recollim tota la dissolució i ho col·loquem en una columna de purificació del kit (Eichman). Ho centrifuguem 1' a 12000rpm . Aleshores venen una sèrie de passos molt sistemàtics i repetitius:

- Afegir $700\ \mu\text{L}$ del Wash Buffer 1 (ve donat per el kit) preparat, és a dir amb etanol. Centrifuguem 1' a 12000G
- Afegir $600\ \mu\text{L}$ del Wash Buffer 2 ("). Centrifuguem 1' a 12000rpm .
- Afegir $250\ \mu\text{L}$ de Wash Buffer 2. Centrifuguem 2' a 12000rpm .
- Passar-ho a un *eppendorf* de 1.5mL (sterile $1.5\ \text{mL}$ RNase-free microcentrifuge tube).
- Afegir $100\ \mu\text{L}$ d' H_2O RNase-free, *nuclease-free* (kit). Centrifuguem 1' 12000rpm .

Aleshores podem mirar la concentració de RNA amb la màquina Nano-Drop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Un cop acabat, ho guardem a -80°C .



Figura 3.1 Màquina Nano-Drop 200, utilitzada per quantificar el RNA de les cèl·lules (Font pròpia).

5. Retrotranscripció

Una vegada tenim el RNA de les cèl·lules hem de transcriure'l a cDNA per poder analitzar l'expressió dels gens. El RNA va ser transcrit amb el seu DNA complementari (cDNA) fent servir un kit: **High Capacity cDNA Archive Kit** ⁽⁴⁰⁾ (Applied Biosystems, CA, USA)..

Primerament fem una mitjana dels valors obtinguts amb el Nano-Drop per saber la quantitat de RNA que tenim. Un cop ho sabem hem de preparar 10 µL de mix ⁽²⁾ i una concentració de RNA de 1000ng en 10 µL de volum final per cada mostra⁽¹⁾. Tot el protocol es realitza en gel perquè treballem amb RNA, fàcilment degradable a temperatura ambient.

- 1- Calculem quin volum hem d'agafar de la nostre solució de RNA per tenir els 1000ng que necessitem. Després, calculem la quantitat d'aigua *nuclease-free* necessària per tenir un volum final de 10 µL en total. Si hem calculat una quantitat de RNA de 4'8 µL hi posarem 5'2 µL d'H₂O .
- 2- La mix (composta per tots els elements necessaris per fer cDNA com els *primers* o dNTPs) és igual per a totes les mostres. Obtindrem 10 µL de mix per 10 µL de mostra. La següent taula mostra les quantitats que hem de posar de cada substància (proporcionada per el kit) per 10 µL de mix : (està recomanat crear-ne per una mostra més per si hi ha algun error durant la preparació)

Taula 5.1 Esquema de la quantitat de µL necessaris de cada component per mostra. Obtingut del kit *High Capacity cDNA Archive Kit*.

Component	Kit (µL per una mostra)
10x RT Buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
Nuclease-free H ₂ O	4.2
Total per reacció	10

Col·loquem l'aigua calculada i el RNA i pipetegem. Afegim el mix a totes les mostres que estem estudiant i fem un *spin* per barrejar i eliminar l'aire. Aleshores tanquem la placa utilitzada (normalment és una de 96 pous, ja que es fan diferents rèpliques dintre una

mateixa mostra) i la col·loquem a la màquina que farà un cicle tèrmic per aconseguir la retrotranscripció (cDNA)

La màquina ha estat programada per fer el següent cicle (*termal cycle*):

Taula 5.2 Esquema dels diferents estats que dur a terme la màquina QuantStudio3 Real-time PCR System (ThermoFisher Scientific Inc.) per aconseguir la transcripció a cDNA. Obtingut del kit *High Capacity cDNA Archive Kit*.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 min	∞

Abans d'iniciar el cicle comprovem que estigui a la opció de 20 µL i que les plaques estan ben col·locades. Després de 2h i 30' tindrem el cDNA per fer la Real Time i llegir els gens.



Figura 4.1 Kit *High Capacity cDNA Archive Kit* on es veuen tots els components de la mix (Font <https://www.fishersci.es/shop/products/applied-biosystems-high-capacity-cdna-reverse-transcription-kit/4/10400745?tab=document#tab12>).

6. Real-time PCR (RT-PCR)

Els nivells d'expressió de cada gen s'analitzen mitjançant la tècnica de PCR a temps real i, gràcies a la màquina QuantStudio3 Real-time PCR System (ThermoFisher Scientific Inc.) amb l'utilització de qPCRBIO SyGreen Mix Lo-Rox Real-time PCR (PCR Biosystems Inc., PA, USA) seguint les instruccions. Es van estudiar els gens CD24, CD44, ALDH i GAPDH; els tres primers son gens específics de les cèl·lules mare i l'últim és el de control (no varia en les condicions estudiades). Aquesta tècnica permet determinar quin gen s'expressa més en la mostra analitzada mitjançant l'emissió de llum detectada per la màquina quan

es realitza la transcripció gènica. Cada gen s'analitza per triplicat en cada mostra i, l'experiment es va realitzar 4 vegades per assegurar que els resultats obtinguts són fiables. Els nivells d'expressió dels gens es van quantificar seguint la fórmula estàndard de $2^{-\Delta\text{CT}}$. Aquesta fórmula té en compte l'expressió obtinguda del gen respecte l'expressió del gen control obtinguda per a cada mostra (normalització).

Taula 6.1 Primers necessaris per analitzar l'expressió dels gens estudiats

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
CD24	CCTCCCAGAGTACTTCCAAC	AGTGAGACCACGAAGAGACT
CD44	TGTGGAGGACAGAAAGCCAAG	TCCCAGCTCCCTGTAATGGTT
ALDH	TCCTGGTTATGGGCCTACAG	CTGGCCCTGGTGGTAGAATA
<i>GAPDH</i>	TCTTCCAGGAGCGAGATC	CAGAGATGATGACCCTTTTG

Tota la preparació es fa sobre una base de gel per preservar el material genètic obtingut prèviament. Primerament hem de fer la preparació del mix en un *ependorf* seguint les instruccions. Per a cada gen en preparam un. (Aquesta és la quantitat en total, però per pou de la placa de 96 són 5 μL de *syber green*, i 0'4 μL de de FW i RW)

- 140 μL de *syber green*
- 11'2 μL de FW (cada gen té el seu)
- 11'2 μL de DW (cada gen té el seu)

Agafem una placa de 96 pous. Farem tres rèpliques internes per a cada mostra i gen, així com pel control de procés (aigua) on els nivells d'expressió haurien de ser nuls; en cas contrari la Real-time no és fiable. Posem 5 μL de mostra de RNA al lateral. Aleshores posem l'aigua als pous de control. Afegim 6 μL de mix de cada gen al pou corresponent a l'altre lateral per evitar contaminació creuada de mostres. Centrifuguem fins que arribi a 3000G i aturem, l'objectiu és obtenir la gota de mostra i mix al final de cada pou de la placa. Introduïm la placa a la màquina QuantStudio3 Real-time PCR System amb el protocol corresponent i esperem els resultats.

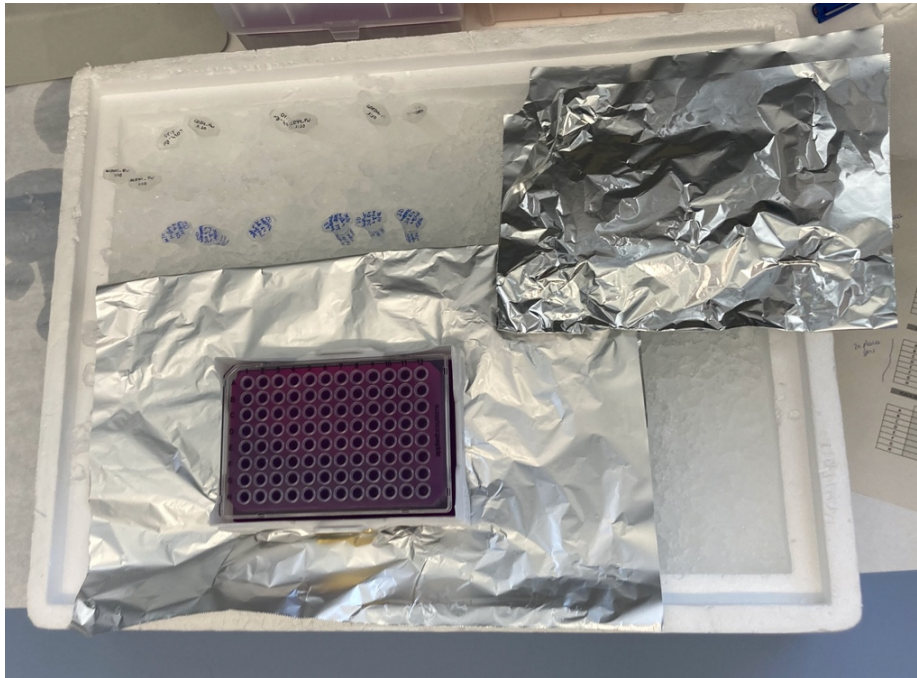


Figura 5.1 Preparació de la Real-time. Veiem la placa de 96 pous, la safata amb gel per mantenir-ho en fred perquè treballem amb RNA i, els microtubs amb les mostres de RNA i els microtubs de mix per a cada gen (Font pròpia).



Figura 5.2 QuantStudio3 Real-time PCR System (ThermoFisher Scientific Inc.), màquina utilitzada per determinar els nivells d'expressió de cada gen (Font pròpia).

7. Anàlisis

Les dades obtingudes van ser analitzades amb el programa *IBM SPSS statistics* mitjançant la prova t de Student per comparar els dos grups i el seu anàlisi. Totes les dades presents en aquest treball s'han representat amb la mitjana \pm desviació estàndard (SEM)

Desviació estàndard: mesura estadística que mesura quant es dispersen els valors al voltant del seu valor mitjà. És a dir, una desviació estàndard baixa indica que tots els valors tenen tendència a estar agrupats al voltant del valor mitjà; mentre que una desviació estàndard alta indica que els valors s'estenen entre uns valors més amplis i llunyans a la mitjana.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. SCAFFOLDS de NANOFIBRES

Amb la tècnica explicada a la metodologia *Fused Filament Fabrication* (15) i la impressora Spraybase, també explicada a la metodologia hem obtingut un *scaffold* de nanofibres de PCL disposades a l'atzar.

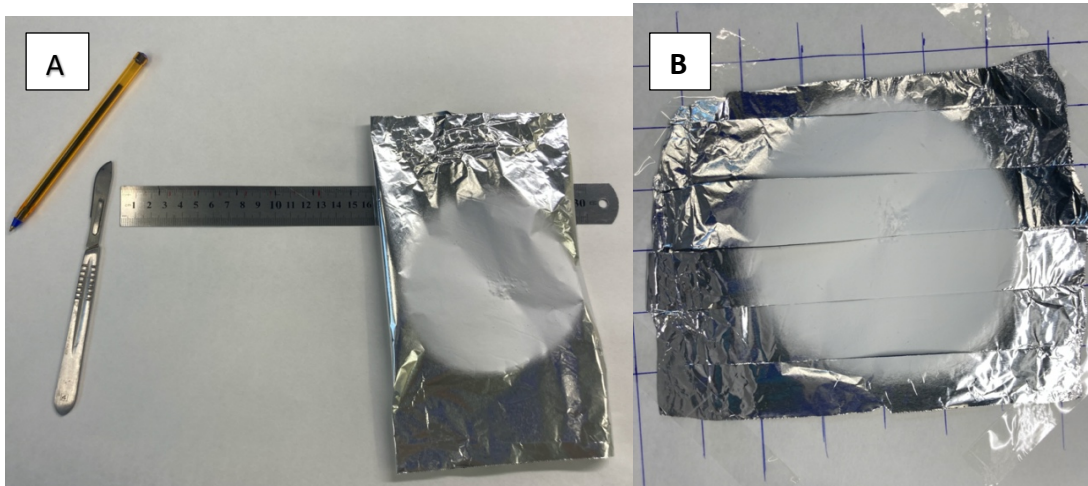


Figura 1.1 (A) Scaffold imprès sobre l'alumini i material necessari (regla, paper, bolígraf i bisturi) per a continuació tallar-lo en els quadrats de mides necessàries per les plaques de 6 pous. **(B)** Scaffold sobre la plantilla dels quadrats a mida i tallat horitzontalment

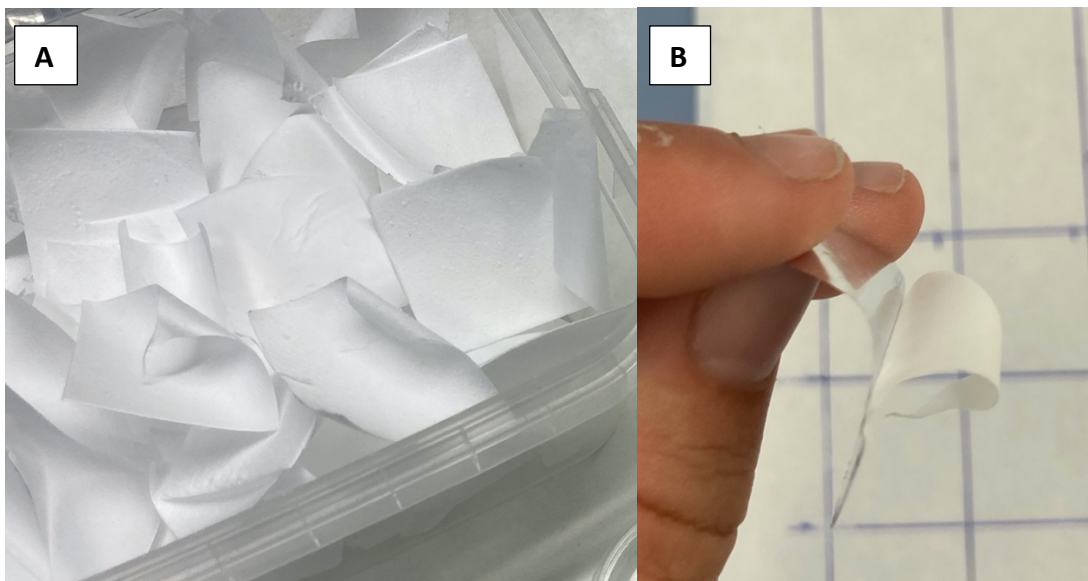


Figura 1.2 (A) Envàs amb *scaffolds* al seu interior ja preparats per ser desinfectats amb etanol i ser utilitzats. **(B)** Scaffold tallat a mida en el procés de separació de l'alumini on s'ha creat el *scaffold*.

Com s'observa a la Figura 1.1 i 1.2 els *scaffolds* es van imprimir sobre un paper d'alumini formant un cercle de nanofibres de PCL extruïdes a l'atzar, sense seguir cap esquema prefixat d'angles i amplitud del filament, amb la intenció de que difereixi el menor possible amb la matriu extracel·lular humana. Podem observar també com posteriorment s'ha tallat amb l'ajuda d'un bisturí i un regle, a la mida corresponent per poder utilitzar-los en diferents suports com les plaques de petri en les figures 1.3 i 1.4. En aquest apartat de resultats s'ha aconseguit disposar de les matrius 3D (*scaffolds*) amb les quals es realitzaren els experiments de cultius cel·lulars posteriors

2. PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES TRIPLE-NEGATIVES 468 EN 2D VERSUS 3D

A la taula següent es mostren les dades de proliferació cel·lular de 3 experiments diferents (R1, R2 i R3) tant en cultiu 2D com en 3D de les cèl·lules de càncer de mama triple negatiu 468WT, cultivades durant 3 dies i analitzades per MTT. S'observen els resultats tant de les tres rèpliques externes com de les internes i els resultats del grup blanc o control on hi havia aigua.

	R1			R2		
2D	1,452	1,445	1,431	1,914	1,93	1,935
	1,464	1,428	1,448	1,388	1,352	1,366
3D	1,581	1,585	1,822	1,549	1,558	1,443
	1,401	1,381	1,37	0,99	1,479	1,513

R3			Blanc		
1,469	1,472	1,456	0,061	0,066	0,068
1,361	1,32	1,301	0,059	0,06	0,062
			0,122	0,122	1,21
1,404	1,34	1,366	0,132	0,133	0,136

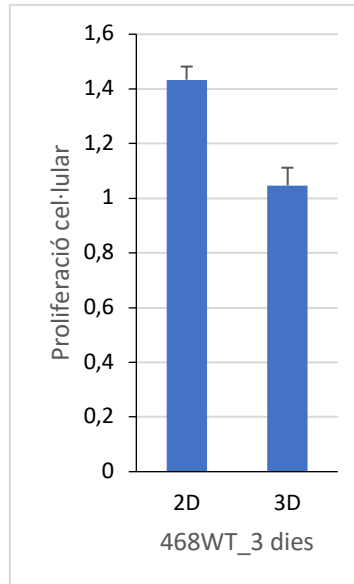


Figura 2.1 Gràfica de la proliferació de les cèl·lules de càncer de mama triple negatiu 468 durant tres dies cultivades en 2D i 3D amb la seva desviació estàndard.

En aquesta gràfica s'observa que les cèl·lules proliferen més en cultiu 2D que en 3D. Això s'ha analitzat mitjançant la tècnica de viabilitat cel·lular MTT. Veiem que hem fet tres rèpliques o experiments independents i de cadascuna, tres rèpliques internes més per evitar possibles errors i garantir que els resultats són fiables i reproduïbles. En els pous "blancs" no es posen cèl·lules i serveixen de grup control. El control no hi ha cèl·lules, per tant, no observem proliferació com és d'esperar.

En els medis de cultiu 2D les cèl·lules estan molt més en contacte una de l'altre i fàcilment es desenvolupen i proliferen, per això observem més proliferació a la Figura 2.1. En canvi, en els cultius 3D els *scaffolds* les cèl·lules es troben més distants unes de les altres fet que provoca que no hi hagi tant contacte cèl·lula-cèl·lula i per tant, no s'alliberin uns factors que activen més la proliferació cel·lular. Tot i això, aquest fet no nega la nostra hipòtesis principal, ja que de les cèl·lules restants poden haver-hi un alt

percentatge de cèl·lules mare tumorals en els cultius 3D; en canvi, en els 2D el percentatge podria ser més baix o quasi nul.

El cultiu amb *scaffolds* afavoreix el creixement i el manteniment de les cèl·lules mare tumorals, en canvi, al cultiu 2D les cèl·lules mare es diferencien i es converteixen en cèl·lules tumorals madures. I al grup de recerca els interessa cultivar i mantenir les cèl·lules mare tumorals ja que es volen estudiar per poder trobar nous fàrmacs per eliminar-les. El cultiu de les cèl·lules mare tumorals és molt difícil i el grup de recerca TargetsLab juntament amb el grup de recerca del GREP són pioners en el cultiu 3D de cèl·lules mare de càncer de mama, tal i com s'observa a diferents publicacions del grup, com ara: *Screening of Additive Manufactured Scaffolds Designs for Triple Negative Breast Cancer 3D Cell Culture and Stem-Like Expansion* ⁽⁴²⁾ i en un premi que els van atorgar: Printing Industry Awards 2019. Premi d'Impressió 3D a la millor aplicació en Salut de 2019: Projecte Oncoen3D. Es va lliurar al Royal College Of Obstetricians & Gynecologists de Londres i van reconèixer la iniciativa de la companyia BCN3D i l'equip ONCOen3D de la Universitat de Girona.

3. MARCADORS DE LA POBLACIÓ BREAST CANCER STEM CELLS

Una vegada analitzada la capacitat de proliferació de les cèl·lules estudiades en els cultius en 2D i 3D, vam voler estudiar si els cultius 3D permeten un enriquiment de la població de BCSCs respecte al cultiu 2D. Per fer-ho, vam procedir a l'extracció de RNA, posterior retrotranscripció per obtenir cDNA i, finalment, analitzar l'expressió de marcadors específics de la població de BCSCs: CD24, CD44 i ALDH1.

En el cas de CD24 i CD44 són marcadors molt utilitzats per a la identificació i aïllament de les CSC de la resta de la població tumoral. Segons s'ha descrit aquesta subpoblació en el càncer de mama presenta un perfil CD44+/CD24-.

	CD24		CD44		ALDH	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
R1	0,196	0,077	0,773	0,497	0,041	0,034
R2	0,092	0,106	0,621	0,995	0,039	0,06
R3	0,443	0,312	0,67	0,845	0,075	0,011
R4	0,242	0,148	0,782	0,97	0,118	0,005

R* (rèpliques)

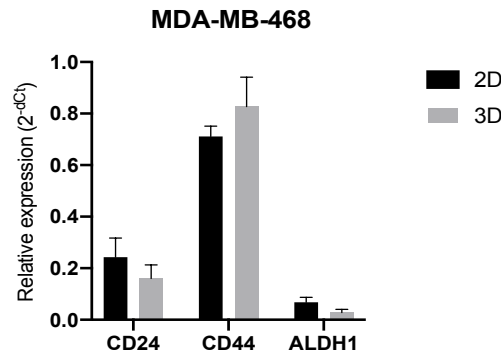


Figura 3.1 Gràfica de l'expressió dels gens CD24, CD44 i ALDH en les cèl·lules de càncer de mama triple negatiu 468WT cultivades en cultius 3D i 2D. A la taula superior, es pot observar els valors obtingut per a cada una de les rèpliques analitzades (R) en 2D vs 3D, per a cada gen. La figura inferior ens mostra l'expressió relativa (eix Y) de cada gen (eix X) en cultiu 2D vs. 3D. Representació de l'expressió relativa i fetes per cada gen i una gràfica final amb la desviació estàndard.

Els resultats obtinguts mostren un clar augment de l'expressió del gen CD44 en el cultiu en 3D respecte les cultivades tradicionalment. En canvi, el gen CD24 mostra una disminució de la seva expressió en cultiu 3D. Pel que fa l'ALDH (enzim) vam observar una disminució de l'expressió en 3D comparat amb 2D. Aquests resultats confirmen la hipòtesi inicialment plantejada. Com s'ha descrit en la introducció, aquests marcadors analitzats estan àmpliament descrits en aquesta subpoblació. S'ha vist que les BCSC mostren una expressió augmentada de CD44 però baixa expressió de CD24, que és el patró que nosaltres observem. Aquests resultats mostren el patró descrit per altres autors en altres estudis com per exemple *Sims-Mourtada et al., 2014*⁽⁴³⁾ i *Feng et al., 2013*⁽⁴⁴⁾. Pel que fa l'ALDH1, s'ha descrit que està molt activada en aquesta població BCSCs i nosaltres no observem aquest augment. Això té una explicació: la tècnica Real-time PCR ens permet analitzar els nivells d'expressió (RNA missatger) dels gens. Per tant, si s'analitza un gen que codifica per un enzim, podràs mirar si augmenta o no l'expressió d'aquest, però no si presenta més activitat (activació) o no. Respecte als gens que nosaltres vam analitzar CD24, CD44 i ALDH, només l'ALDH és un enzim, els altres son

receptors de membrana. Per tant, la disminució de l'expressió en cultiu 3D d'aquest gen no pot ser conclouent de si hi ha igual menor activitat de l'enzim. S'han de fer més estudis per poder validar-ho. Per mirar l'activitat de cada gen existeixen anàlisis d'activitat enzimàtica que consisteixen per exemple a addicionar el substrat de l'enzim i veure si aquest desapareix o no (si desapareix vol dir que l'enzim l'utilitza). Aquestes tècniques son desenvolupades amb diferents KITS comercials com *Aldehyde dehydrogenase Activity Colorimetric Assay* o un altre és ALDEFLUOR™ kit. La tècnica estudia l'activitat enzimàtica de cada gen.

El grup de recerca *TargetsLab* juntament amb el grup de recerca del GREP han estudiat juntament amb altres publicacions i articles la proliferació de les CSC en els cultius 3D respecte a les 2D “ Screening of Additive Manufactured Scaffolds Designs for *Triple Negative Breast Cancer 3D Cell Culture and Stem-Like Expansion*” de a Polonio-Alcalá, Marc Rabionet, Antonio J. Guerra, Marc Yeste , Joaquim Ciurana i Teresa Puig ⁽⁴⁴⁾.

CONCLUSIONS

- Els *scaffolds* de nanofibres de PCL extruïdes a l'atzar presenten característiques similars a les condicions *in vivo* de les cèl·lules del cos humà, és a dir la matriu extracel·lular.
- El material PCL i la seva distribució en els *scaffolds* presenta unes propietats que permeten a les cèl·lules proliferar i desenvolupar-se similarment a les seves condicions en el cos humà.
- Les cèl·lules mare tumorals necessiten ser cultivades en cultius que no difereixin del seu estat *in vivo* perquè no pateixin la diferenciació i perdin les qualitats de cèl·lules mare tumorals.
- Els cultius tradicionals presenten una major reproducció cel·lular que els cultius en tres dimensions en quan a quantitat de cèl·lules resultants.
- Les cèl·lules mare tumorals presenten un augment d'expressió del gen CD44+ i una disminució del gen CD24- respecte les cèl·lules tumorals en cultius 3D *versus* 2D.
- El cultiu cel·lular en 3D mitjançant *scaffolds* sembla enriquir la població de BCSCs en comparació al cultiu en 2D.

BIBLIOGRAFIA

1. https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm (04-2021)
2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18637487/> (04-2021)
3. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/mas-informacion/evolucion-cancer-mama#:~:text=Actualmente%2C%20seg%C3%BAAn%20datos%20del%20Observatorio,1%20de%20cada%208%20mujeres.> (04-2021)
4. <http://www.biooncology.com/research-education.> (04-2021)
5. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (04-2021)
6. <https://gco.iarc.fr/> (04-2021)
7. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq> (04-2021)
8. Giró-Perafita A., Palomeras S., Lum D. H., Blancafort A., Viñas G., Oliveras G., Pérez-Bueno F., Sarrats A., Welm A. L. & Puig T. (2016). *Preclinical Evaluation of Fatty Acid Synthase and EGFR Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. Clinical Cancer Research* (04-2021)
9. Telli, M. L. (2016). *Triple-Negative Breast Cancer. In Molecular Pathology of Breast Cancer (pp. 71–80). Springer International Publishing.* (24-04-2021)
10. <https://juntosxtusalud.com/celulas-tumorales-como-aparecen-y-que-caracteristicas-tienen> (05-2021)
11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S071686401370659X#bib0020> (05-2021)
12. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metastasis> (05-2021)
13. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria-131-articulo-celulas-madre-tumorales-una-diana-S0214158212700245> (05-2021)
14. Dittmer J., & Rody A. (2013). *Cancer stem cells in breast cancer. Histology and Histopathology* (05-2021)

15. Carey L. A., Dees E. C., Sawyer L., Gatti L., Moore D. T., Collichio F., Ollila D. W., Sartor C. I., Graham M. L. & Perou C. M. (2007). *The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. Clinical Cancer Research.* (05-2021)
16. Li et al, 2021 (05-2021)
17. Sung et al, 2021. (05-2021)
18. Palomeras et al, 2018 (05-2021)
19. Carey et al, 2007 (05-2021)
20. Xing et al, 2010 (05-2021)
21. S. Ringer, *Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle, J. Physiol* (06-2021)
22. Ehrmann R.L, Gey G.O, *The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen, JNCI J. Natl. Cancer Inst.* (06-2021)
23. E. Polonio-Alcalá, M. Rabionet, S. Ruiz-Martínez, J. Ciurana, T. Puig, *Three-Dimensional Manufactured Supports for Breast Cancer Stem Cell Population Characterization, Curr. Drug Targets* (06-2021)
24. C.F. Amstein, P.A. Hartman, *Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge., J. Clin. Microbiol.*(06-2021)
25. C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance., J. Cell Sci.* 123 (2010) 4195–200. (06-2021)
26. C.H. Thomas, J.H. Collier, C.S. Sfeir, K.E. Healy, *Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 1972–7 (-06-2021)
27. J.S. Hale, M. Li, J.D. Lathia, J.S. Hale, M. Li, J.D. Lathia, *The malignant social network The malignant social network Cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells.* (06-2021)
28. <https://doi.org/10.4161/cam.21294>. (06-2021)
29. T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P.A. Janmey, *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, Cell Motil. Cytoskeleton.* (06-2021)

30. B.A. Reynolds, S. Weiss, *Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell.*, *Dev. Biol.* 175 (1996) 1–13. (06-2021)
31. S. Weiss, B.A. Reynolds, A.L. Vescovi, C. Morshead, C.G. Craig, D. van der Kooy, *Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?*, *Trends Neurosci.* 19 (1996) 387–93. (06-2021)
32. F.L. Shaw, H. Harrison, K. Spence, M.P. Ablett, B.M. Simões, G. Farnie, R.B. Clarke, *A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity.*, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 17 (2012) 111 (05-2021)
33. O. WICHTERLE, D. LÍM, *Hydrophilic Gels for Biological Use*, *Nature.* 185 (1960) 117–118. (05-2021)
34. K. Saha, J.F. Pollock, D. V Schaffer, K.E. Healy, *Designing synthetic materials to control stem cell phenotype*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 381–387. (05-2021)
35. M. Domingos, D. Dinucci, S. Cometa, M. Alderighi, P.J. Bártolo, F. Chiellini, *Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications*, *Int. J. Biomater* (05-2021)
36. A. Giró Perafita, M. Rabionet, T. Puig, J. Ciurana, *Optimization of Poli(ε-caprolactone) Scaffolds Suitable for 3D Cancer Cell Culture*, *Procedia CIRP.* 49 (2016) 61–66. (05-2021)
37. S.J. Hollister, R.D. Maddox, J.M. Taboas, *Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints*, *Biomaterials.* 23 (2002) 4095–4103 (06-2021)
38. S.P. Barton, R. Marks, *Measurement of collagen-fibre diameter in human skin.*, *J. Cutan. Pathol.* 11 (1984) 18–26. (06-2021)
39. A. Cipitria, A. Skelton, T.R. Dargaville, P.D. Dalton, D.W. Hutmacher, *Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review*, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 9419–9453 (06-2021)
40. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012664_GeneJET_RNA_Purification_U

G.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogR2VuZUpFVCBSTkEgUHVyaWZpY2F0aW9uIEtpdA== (07-2021)

41. *<https://www.fishersci.es/shop/products/applied-biosystems-high-capacity-cdna-reverse-transcription-kit-4/10400745?tab=document#tab12> (07-2021)*
42. *Emma Polonio-Alcalá , Marc Rabionet , Antonio J. Guerra , Marc Yeste , Joaquim Ciurana and Teresa Puig. Screening of Additive Manufactured Scaffolds Designs for Triple Negative Breast Cancer 3D Cell Culture and Stem-Like Expansion (08-2021)*
43. *Sims-Mourtada et al., 2014 (08-2021)*
44. *Feng et al , 2013 (08-2021)*