

## Resum

Mentre que gran part dels cultius cel·lulars *in vitro* es realitzen en substrats bidimensionals (2D), la majoria de les matrius extracel·lulars *in vivo* tenen una estructura tridimensional (3D). Com a conseqüència, les cèl·lules es comporten de manera diferent en el cultius 2D davant respostes d'adaptació a l'ambient no fisiològic. Açò ha fomentat el desenvolupament de cultius més realistes amb la finalitat de proporcionar models més representatius per a la biomedicina (com per exemple càncer, descobriment de nous fàrmacs i enginyeria de teixits) i obtenir un millor coneixement del mecanismes biològics relacionats amb la dimensionalitat. S'han desenvolupat diferents sistemes de cultiu 3D encara que la seua variabilitat i complexitat dificulten el seu establiment com a procediments de cultius cel·lulars comuns. Per este motiu esta tesi tracta el problema de la dimensionalitat en les interaccions cèl·lula/material e introdueix el cultiu tipus *sandwich* com a una ferramenta versàtil per a estudiar el comportament cel·lular. Cèl·lules cultivades en este sistema utilitzen tant els receptors ventrals com els dorsals per a adherir-se y estendre's, experimentant canvis importants respecte als cultius 2D y aproximant-se a les condicions 3D.

L'estimulació del receptors dorsals ha sigut prèviament abordada cobrint les cèl·lules ja adherides a una superfície 2D amb un gel proteic. Ací nosaltres proposem un sistema tipus *sandwich* que consistix en dos superfícies 2D, de manera que permet estudiar un ampli espectre de condicions canviant la natura del substrat (material, topografia...) i el recobriment proteic, tant del material ventral com del dorsal.

Ja que els cultius tipus *sandwich* proporcionen una adhesió cel·lular alterada respecte al substrats 2D tradicionals degut a l'excitació dels receptors dorsals, s'esperen canvis en les rutes de senyalització intracel·lulars que podrien alterar processos importants com la proliferació, morfologia, migració i diferenciació cel·lular. Per això esta tesi avalua també l'efecte que diferents paràmetres del cultiu tipus *sandwich* tenen sobre el comportament cel·lular.

Primer es va avaluar la resposta cel·lular en quant a morfologia, proliferació i adhesió. Es van estudiar diferents condicions com materials amb propietats diferents o recobriments proteics (en els substrats dorsal i ventral), així com l'efecte de realitzar el *sandwich* just després de la sembra o després de permetre l'adhesió cel·lular inicial al substrat ventral. Es van obtenir resultats interessants com la relació existent entre la habilitat cel·lular de reorganitzar la matriu extracel·lular amb la morfologia, proliferació i adhesió cel·lular, similarment al que s'observa en hidrogels 3D (en sistemes degradables respecte a no degradables).

A continuació es va estudiar la migració cel·lular en el cultiu tipus *sandwich* mitjançant assajos *wound healing*. Els resultats revelaren l'efecte clau que tant el substrat ventral com el dorsal tenen en l'índex i model de migració cel·lular. A més, les cèl·lules migrant en el cultiu tipus *sandwich* presentaren una morfologia allargada pareguda a la observada en altres cèl·lules cultivades en sistemes 3D. Més enllà de les diferències en morfologia i migració cel·lular, l'estimulació dorsal va promoure el remodelat de la matriu extracel·lular en comparació amb la simple activació dels receptors ventrals en cultius 2D.

Finalment es va avaluar l'efecte del cultiu tipus *sandwich* en la diferenciació cel·lular. Primer s'observà un increment en la diferenciació miogènica de cèl·lules C2C12 quan es cultivaren en el sistema tipus *sandwich*. Aquest increment es dependent de l'estimulació dorsal i està relacionat amb una alteració de la senyalització cel·lular i la secreció de factors paracrins. Per a determinar si el cultiu tipus *sandwich* dirigeix la diferenciació cel·lular únicament al llinatge miogènic o permetix la diferenciació cap a altres llinatges, es van cultivar 4 línies de cèl·lules humanes mesenquimals diferents en les mateixes condicions. Els resultats mostraren que les mateixes condicions de cultiu provocaren diferent diferenciació cel·lular. Aquest resultat destaca la importància de l'entorn proporcionat pel nínxol cel·lular *in vivo*, que determina el destí cel·lular i, per tant, la necessitat d'imitar-lo adequadament *in vitro*.

En general, l'entorn oferit pel cultiu tipus *sandwich* canvia el comportament cel·lular cap a patrons característics dels sistemes 3D demostrant la importància que aquesta aproximació simple i versàtil té per a imitar entorns cel·lulars *in vivo*.