

## Resumen

Mientras que la mayoría de los cultivos celulares *in vitro* son realizados en sustratos bidimensionales (2D), la mayoría de las matrices extracelulares *in vivo* son tridimensionales (3D). Por consiguiente, las células se comportan de manera diferente en los cultivos 2D a modo de adaptación al ambiente no fisiológico. Este hecho ha fomentado el desarrollo de condiciones de cultivo más relevantes con el fin de proporcionar modelos más representativos para la biomedicina (como por ejemplo cáncer, descubrimiento de nuevos fármacos e ingeniería de tejidos) y obtener un mayor conocimiento de los mecanismos biológicos relacionados con la dimensionalidad. Se han desarrollado distintos sistemas de cultivo 3D aunque su variabilidad y complejidad dificultan su establecimiento como procedimientos de cultivo celular comunes. Por ello esta tesis trata el problema de la dimensionalidad en las interacciones célula/material e introduce el cultivo tipo *sandwich* como una herramienta versátil para estudiar el comportamiento celular. Células cultivadas en este sistema utilizan tanto los receptores ventrales como los dorsales para adherirse y extenderse, experimentando cambios importantes respecto a los cultivos 2D y acercándose a condiciones 3D.

La estimulación de los receptores dorsales ha sido previamente abordada cubriendo células ya adheridas a una superficie 2D con un gel proteico. Aquí nosotros proponemos un sistema tipo *sandwich* que consiste en dos superficies 2D, de forma que se pueden estudiar un mayor espectro de condiciones cambiando la naturaleza del sustrato (material, topografía...) y el recubrimiento proteico, tanto del material ventral como el dorsal.

Puesto que los cultivos tipo *sandwich* proporcionan una adhesión celular alterada respecto a los sustratos 2D tradicionales debido a la excitación de los receptores dorsales, se esperan cambios en las rutas de señalización intracelulares, lo que podría alterar procesos importantes como la proliferación, morfología, migración y diferenciación celular. Por ello esta tesis evalúa el efecto que diferentes parámetros del cultivo tipo *sandwich* tienen sobre el comportamiento celular.

Primero se evaluó la respuesta celular tras la adhesión en términos de morfología, proliferación y adhesión. Se estudiaron diferentes condiciones como materiales con diferentes propiedades o recubrimientos proteicos (en los sustratos dorsal y ventral), así como el efecto de realizar el *sandwich* justo después de la siembra o tras permitir una adhesión celular inicial al sustrato ventral. Se obtuvieron resultados interesantes como la relación existente entre la habilidad celular de reorganizar la matriz extracelular con la morfología, proliferación y adhesión celular, de manera similar a lo observado en hidrogeles 3D (en sistemas degradables respecto a no degradables).

A continuación se estudió la migración celular en el cultivo tipo *sandwich* por medio de ensayos *wound healing*. Los resultados revelaron el efecto clave que tanto el sustrato ventral como el dorsal tienen en el índice y modelo de migración usado por las células. Además las células migrando en el cultivo tipo *sandwich* presentaban una morfología alargada parecida a la de otras células migrando en sistemas 3D. Más allá de las diferencias en morfología y migración celular, la estimulación dorsal promovió el remodelado de la matriz extracelular con respecto a la simple activación de los receptores ventrales en los cultivos 2D.

Finalmente se evaluó el efecto del cultivo tipo *sandwich* en la diferenciación celular. Primero mostramos un incremento en la diferenciación miogénica de células C2C12 cultivadas en el sistema tipo *sandwich*. Dicho incremento es dependiente de la estimulación dorsal y está relacionado con una alteración de la señalización intracelular y secreción de factores paracrinos. Para determinar si el cultivo tipo *sandwich* dirige la diferenciación celular únicamente al linaje miogénico o permite diferenciación hacia otros linajes, se cultivaron 4 líneas de células humanas mesenquimales bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron que las mismas condiciones del cultivo tipo *sandwich* provocaron diferente diferenciación celular. Este resultado destaca la importancia del entorno proporcionado por el nicho celular *in vivo*, el cual determina el destino celular, y por tanto la necesidad de imitarlo adecuadamente *in vitro*.

En general, el entorno ofrecido por el cultivo tipo *sandwich* cambia el comportamiento celular hacia patrones característicos de sistemas 3D, demostrando la importancia de esta aproximación simple y versátil para imitar entornos celulares *in vivo*.