

Universitat Politècnica de València

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)

Producción y caracterización de microesferas de alginato funcionalizadas con colágeno y ácido hialurónico como soporte tridimensional para el cultivo de células de mieloma múltiple.



GRADO EN BIOTECNOLOGÍA (2015-2019)

TRABAJO FINAL DE GRADO

BLANCA DÍAZ BENITO

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: JUAN CARLOS MARIN PAYÁ

TUTOR COLABORADOR: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 8 de Julio de 2019

Producción y caracterización de microesferas de alginato funcionalizadas con colágeno y ácido hialurónico como soporte tridimensional para el cultivo de células de mieloma múltiple.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por una expansión clonal de las células plasmáticas (CPs). Los cultivos 2D convencionales se ha visto que no consiguen reproducir el desarrollo de la enfermedad y actualmente se están llevando a cabo diseños y desarrollos de modelos de cultivo 3D que permitan reproducir “*in vitro*” el comportamiento de las CPs y su resistencia a fármacos mediada por el microambiente medular. La progresión a una medicina personalizada sería un hecho realista con un modelo 3D que permita el cultivo de células *ex vivo* de pacientes.

El objetivo principal del siguiente trabajo ha consistido en desarrollar un modelo de cultivo 3D basado en microgel, que mediante el recubrimiento de las microesferas con distintas biomoléculas procedentes de la médula ósea, como son el colágeno tipo I y el ácido hialurónico (HA), permita evaluar la influencia de estas biomoléculas en la proliferación celular de las CPs.

El microgel ha sido producido mediante un sistema de microfluídica, permitiendo obtener microesferas de alginato de un tamaño comprendido 170-190 μm , y con un alto rendimiento. Las microesferas fueron funcionalizadas con Colágeno Tipo I y ácido hialurónico por el método Layer-by-Layer. La presencia de Colágeno y HA en las microesferas se confirmó de forma cualitativa por FTIR, mientras que, por medio de BCA se evaluó de forma cuantitativa la presencia de Colágeno Tipo I.

Posteriormente, las células de la línea RPMI 8226 se cultivaron en suspensión agitada y entre las microesferas del microgel. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo PicoGreen. Se observaron diferencias significativas de proliferación dependiendo de las condiciones de cultivo: células en suspensión agitada, microgel sin funcionalizar y microgel funcionalizados con HA, Col y ambas biomoléculas.

En definitiva, el desarrollo de un cultivo 3D basado en microgel presenta diferencias significativas en cuanto a la proliferación de las CPs con respecto a células en suspensión, observándose mayores diferencias en los microgeles recubiertos con HA. Esto corroboraría la importancia de desarrollar entornos 3D que permitan reproducir “*in vitro*” el microambiente medular.

Palabras clave: microfluídica; microesferas; cultivo tridimensional; mieloma múltiple; alginato

ALUMNA: BLANCA DÍAZ BENITO

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: JUAN CARLOS MARIN PAYÁ

TUTOR COLABORADOR: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 8 de Julio de 2019

Obtaining and characterization of alginate microspheres functionalized with collagen and hyaluronic acid as a three-dimensional support for the culture of multiple myeloma cells.

Multiple myeloma is a hematological neoplasm characterised by a clonal expansion of plasmatic cells (PC). Conventional 2D cultures aren't able to reproduce the development of the disease, so, 3D culture models are currently being developed in order to allow the "in vivo" reproduction of plasmatic cells behaviour and their resistance to drugs mediated by the bone marrow (BM) microenvironment. Progression to a personalized medicine would be a realistic fact with this 3D models for cell *ex vivo* culture.

The main objective of this work is the development of a microgel based 3D cell culture model, that due to their coating with different biomolecules originated in the bone marrow, like the type I collagen and hyaluronic acid, allows to evaluate the influence of this biomolecules in the proliferation of PC.

The microgel has been produced in a microfluidic system, allowing us to obtain alginate microspheres of an average size of between 170-190 μm and optimum production throughput. Microspheres were functionalized with type I collagen and hyaluronic acid by a layer-by-layer method. The material characterization of the different coatings applied was made by the means of Fourier transformed infrared spectroscopy, while the type I collagen coating was essayed through bicinconinic acid essay (BCA).

RPMI 8226 cell line has been cultivated between the microgel microspheres by maintaining the suspension in an orbital shaker. Cell proliferation was evaluated through PicoGreen assay. There were significant differences in proliferation depending on culture conditions: cells in suspension, cells with microgel and cells with different functionalized microgels.

Definitely, the development of a microgel based 3D culture presents significant differences regarding the proliferation of the PC when compared to cells in suspension, observing this way major differences in microgels coated with hyaluronic acid. This fact would bear out the importance of developing 3D models that allow "in vitro" reproduction of the BM microenvironment.

Key words: microfluidic; microspheres; alginate; microfluidic; three-dimensional support; multiple myeloma

STUDENT: BLANCA DÍAZ BENITO

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: JUAN CARLOS MARIN PAYÁ

TUTOR HELPER: LUIS AMARO MARTINS

Valencia, 8 de Julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

A José Luis por darme la oportunidad en este grupo de laboratorio. Me siento muy agradecida por todo lo aprendido.

A Luis por darme ánimos cada día, demostrarme lo que de verdad importa en la investigación y motivarme a ser mejor persona. Você é o melhor. Te admiro muito.

Y en especial a Juan Carlos. No has sido mi primer jefe pero sí el que mejor canta. Gracias por estos meses, no hay tractors suficientes en Albacete para agradecerte esta experiencia. Espero sinceramente que volvamos a coincidir.

Sigamos fluyendo.

ÍNDICE

1.	MIELOMA MÚLTIPLE.....	1
1.1.	PATOGÉNESIS Y SUBTIPOS MOLECULARES.....	1
1.2.	ETIOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA.....	2
1.3.	EVOLUCIÓN CLONAL.....	3
1.4.	DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	4
1.5.	MÉDULA OSEA Y MICROAMBIENTE TUMORAL.....	4
1.5.1.	Compartimento no celular e importancia en el desarrollo de resistencia a fármacos.....	5
1.5.2.	Colágeno y ácido hialurónico en la matriz extracelular.....	6
1.6.	REVISIÓN DE LAS ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS: PASADO Y ACTUALIDAD.....	7
1.7.	MODELOS DE MIELOMA MÚLTIPLE TRIDIMENSIONALES.....	8
1.7.1.	2D VS 3D.....	8
1.7.2.	Ingeniería tisular y soportes 3D.....	8
1.8.	ALGINATO COMO BIOMATERIAL.....	9
1.9.	MICROFLUÍDICA Y APLICACIÓN PARA PRODUCIR MICROGELES.....	10
2.	OBJETIVOS.....	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1.	PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO.....	13

3.1.1.	Fluidos empleados.....	13
3.1.2.	Descripción del sistema de microfluídica.....	13
3.1.3.	Obtención de microesferas de alginato.....	14
3.1.4.	Cuidado del dispositivo.....	15
3.2.	FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS CON COLÁGENO Y ÁCIDO HIALURÓNICO.....	15
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO.....	16
3.3.1.	Estudio de la influencia de los flujos de medio continuo y disperso sobre el tamaño de las microesferas.....	16
3.3.2.	Evaluación del rendimiento del proceso de producción.....	18
3.3.3.	Caracterización morfológica mediante FESEM.....	18
3.3.4.	Caracterización de los recubrimientos de Layer-by-Layer.....	19
3.4.	CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LA LÍNEA CELULAR RPMI8226 ...	19
3.4.1.	Protocolo superficie.....	20
3.4.2.	Protocolo intracelular.....	20
3.5.	CULTIVO DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS TUMORALES DE LA LÍNEA RPMI8226 CON EL MICROGEL FUNCIONALIZADO.....	21
3.5.1.	Descongelación de la línea RPMI8226 y condiciones de cultivo.....	21
3.5.2.	Cultivo de la línea celular RMPI8226 en suspensión y con microgel.....	21
3.5.3.	Estudio de la proliferación mediante ensayo PicoGreen.....	22
3.6.	ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1.	JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE FLUIDOS.....	24
4.2.	ESTUDIO DE TAMAÑO DE PARTICULA Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS.....	24

4.3.	RENDIMIENTO DE CONDICIONES ESTUDIADAS	26
4.4.	INFLUENCIA DEL FLUJO DE CLOROFORMO EN EL TAMAÑO: ELECCIÓN DE CONDICIÓN ÓPTIMA.....	26
4.5.	MICROESFERAS DE ALGINATO: TOPOLOGÍA Y MORFOLOGÍA	28
4.6.	CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DEL COLÁGENO EN EL RECUBRIMIENTO ..	29
4.7.	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FTIR	30
4.8.	INMUNOFENOTIPO DE LA LÍNEA CELULAR RPMI 8226.....	31
4.9.	ENSAYO PICOGREEN	33
4.10.	ANÁLISIS ANOVA DE DOS FACTORES.....	35
5.	CONCLUSIONES.....	36
	ANEXO I. HISTROGRAMAS DE LAS CONDICIONES A ESTUDIO.....	40
	ANEXO II. ESPECTROS FTIR AMPLIFICADOS.....	41
	ANEXO III: ESTUDIO ESTADÍSTICO ANOVA	42

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Condiciones propuestas para estudiar la influencia de los flujos de medio continuo y disperso sobre el tamaño de partícula.	17
TABLA 2: Condiciones para el segundo estudio de la influencia de los flujos en el tamaño de partícula obtenido.	17
TABLA 3: Panel de anticuerpos monoclonales de superficie.	20
TABLA 4: Panel de anticuerpos monoclonales intracelular.....	20
TABLA 5: Tamaño promedio de partícula obtenido en cada condición junto con desviación estándar.....	24
TABLA 6: Tamaño promedio de microesfera para cada condición, junto con SD	27
TABLA A.....	Anexo III
TABLA B.....	Anexo III

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema de la interacción bidireccional de las células MM con BM (Di Marzo L et al., 2016)	5
FIGURA 2: Diseño detallado del sistema flow-focusing, donde se puede ver la geometría de los canales del sistema así como las dimensiones del dispositivo de microfluídica.	13
FIGURA 3: Dispositivo preparado para su uso, de izda a dcha: tubo de salida, tubo entrada de fase dispersa, tubo de entrada de fase continua.....	14
FIGURA 4: Esquema simplificado del proceso de producción de microesferas, donde se puede observar la producción de la microgota de alginato, así como los pasos posteriores de gelificación y recolección de microesferas producidas.....	15
FIGURA 5: Esquema gráfico de la funcionalización de las microesferas de alginato mediante Lbl	16
FIGURA 6: Representación gráfica de la influencia de los flujos de medio disperso y continuo sobre el tamaño de microesferas. El diámetro de las esferas representadas es proporcional a los tamaños de microesferas obtenidos en cada condición.	25
FIGURA 7: Representación del rendimiento en peso (mg) para cada condición, para un tiempo de operación de 4 minutos.	26
FIGURA 8: Representación de tamaño promedio de cada condición (de A a E, de izda a dcha) 27	
FIGURA 9: Histograma de tamaños de microesferas con un flujo de medio disperso 0.13mL/min, y un flujo de medio continuo 6.2mL/min. Se puede observar la homogeneidad de dicha población muestral (N=245).	28
FIGURA 10: Imágenes de las microesferas de alginato cálcico tomadas en FESEM. En la imagen b) se aprecia la superficie homogénea y rugosa de una microesfera escogida al azar. Por último, las imágenes c),d), y e) muestran la porosidad y rugosidad del biomaterial.....	29
FIGURA 11: Representación gráfica de la cuantificación de $\mu\text{g Col I/mg}$ de microesfera.	30
FIGURA 12: Visualización de espectros FTIR de control de microesferas (Control), de microesferas acabadas en capa de HA (HA) y acabadas en capa de Col I (Col I). Las flechas indican las bandas características a destacar.	31

FIGURA 13: Diagrama de puntos para verificar el patrón inmunofenotípico de las CPs.	32
FIGURA 14: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 2. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).....	33
FIGURA 15: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 5. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).....	34
FIGURA 16: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 7. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).....	34
FIGURA A.....	Anexo I
FIGURA B.....	Anexo II
FIGURA C.....	Anexo II

ABREVIATURAS

ACS: *American Cancer Society*

Alg: Alginato sódico

APC: alofocianina

ATCC: Colección Americana de Tipos Celulares (albúmina de suero bovino (BSA)

BM: Médula ósea (*Bone Marrow*)

BMSCs: Células madre estromales de medula ósea (*Bone Marrow Stem Cells*)

CaCl₂: Cloruro cálcico

CMF: Citometría de flujo

Col I: Colágeno tipo I

CP: Células plasmáticas

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECM: Matriz extracelular (*Extracellular Matrix*),

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: suero fetal bovino (*Fetal Bovien Serum*)

FIB: Haz de iones focalizados (*Focused Ion Beam*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto

HA: Ácido hialurónico

h-MM: Pacientes de mieloma múltiple hiperdiploides

HSC: Células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic stem cells*)

HV500: *Horizon Violet500*

Ig: Inmunoglobulinas

IL-6: Interleuquina-6

IMWG: *International Myeloma Working Group*

IT: Ingeniería tisular

Lbl: Layer-by-Layer

mAbs: Anticuerpos monoclonales (Monoclonal Antibodies)

min: minutos

MM: Mieloma Múltiple

MMP: Metaloproteinasas de matriz extracelular

NF-Kb: Factor nuclear kB

nh-MM: Pacientes de mieloma múltiple no-hiperdiploides

NK: Natural killers

NSF: *National Science Foundation*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*)

PDMS: poli-dimetil siloxano

PE: ficoeritrina

PerCP: proteína clorofila peridina

PLA: Ácido poliláctico

RE: Retículo endoplasmático

SD: desviación estándar (*Standard Deviation*)

T.A: Temperatura Ambiente

TBE: Tris Borato EDTA

TE: Tris EDTA

UP: Ultra pura

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

1. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica incurable y biológicamente heterogénea. Está caracterizada por una proliferación monoclonal incontrolada de células plasmáticas en la medula ósea que deriva en una sobreproducción de inmunoglobulinas monoclonales o cadenas de inmunoglobulinas afuncionales. La acumulación de estas inmunoglobulinas (Ig) y la interacción de células plasmáticas anómalas con otras células de la medula ósea conducen a una multitud de problemas, incluyendo anemia, lesión ósea, infecciones, hipercalcemia, fallo renal, fatiga y dolor (Gerecke C et al., 2016). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el MM se clasifica como una enfermedad diferente al resto de neoplasias monoclonales hematológicas como son la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el plasmacitoma solitario de hueso y el plasmacitoma extraóseo. (Hideshima T et al., 2007)

El MM es la segunda enfermedad hematológica maligna más común, concretamente constituye un 10% de éstas (Collins C, 2010; Moreau, P et al., 2017). La incidencia es de 4,5-6 cada 100000 personas al año en Europa, siendo principalmente las afectadas personas de edad avanzada, entre 65 y 70 años, siendo la raza africano-americana más predispuesta a ello. En 2018, la incidencia fue mayor a los 30000 casos en EEUU previstos por la *American Cancer Society* (ACS). Un dato alarmante, en este año 2019, se prevén 12960 muertes en EEUU. (CANCER STAT FACTS: MYELOMA, 2018).

1.1. PATOGÉNESIS Y SUBTIPOS MOLECULARES

El MM no es una enfermedad sino un conjunto de ellas, cada una definida por un subtipo con anomalías citogenéticas y genéticas específicas. Estudios actuales sugieren que el MM progresa a partir de GMSI, aunque los mecanismos de transformación de células plasmáticas normales a dicho estado siguen siendo desconocidos (Landgren O et al., 2009). Se ha demostrado que una desregulación de la familia de proteínas de ciclinas D es común a todos los pacientes en estado temprano (Bergsagel PL et al., 2005) Existen multitud de mecanismos que ocasionen una desregulación de ciclinas D, como: (i) translocaciones de CCND1 (ciclina D1) y CCND3 (ciclina D3) con el gen IgH, (ii) amplificaciones del gen ciclina D, (iii) trisomías, y (iv) otros eventos citogenéticos (Broyl A et al., 2010). Sin embargo, una sobreexpresión de la expresión de ciclinas D no es suficiente, por si misma, para pasar de GMSI a MM.

Tras la desregulación de una o más proteínas ciclinas, se requieren además cambios genéticos adicionales para intensificar el potencial proliferativo de las células plasmáticas anómalas de un MM. En etapas tempranas, se producen eventos como la pérdida del cromosoma 13 (sitio del gen supresor de tumores, retinoblastoma) y la adquisición de mutaciones que activan oncogenes RAS y MYC (Chiechio L et al., 2009; Chng WJ et al., 2011) Dichos eventos están presentes en una mayor proporción cuando la enfermedad está avanzada. Así pues, es común en estadios tardíos, la inactivación de la ruta regulatoria transcripcional del factor nuclear kB (NF-Kb). Como consecuencia, se produce un descontrol entre la interacción de

las células MM con el estroma de la medula ósea. Este hecho explica el crecimiento extramedular de células MM y en el desarrollo de leucemias de células plasmáticas independientes de estroma.

Recientemente, mediante estudios epigenéticos se ha podido comprobar alteraciones en la metilación de DNA y en la metilaciones y acetilación de histonas, siendo más frecuentes en estados avanzados de MM (Dimopoulos K *et al.*, 2014)

El MM a pesar de ser una enfermedad heterogénea mediante estudios de cariotipado se ha conseguido agrupar a los pacientes en dos subtipos predominantes con rutas oncogénicas diferenciadas. Por un lado pacientes hiperdiploides (h-MM) con una o más trisomías en cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 representando un 40% de todos los casos de MM y por otro lado, pacientes no-hiperdiploides (nh-MM), los cuales engloban hipodiploides, pseudodiploides y casi tetraploides MM, con un alto enriquecimiento en translocaciones IgH, y constituyen un 20% de los casos (Chng WJ *et al.*, 2007). Destacan las translocaciones entre el locus IgH en 14q32 y oncogenes en 11q13 y 4p16; como consecuencia, se produce una sobreexpresión del gen ciclina D y la desregulación de la ciclina D2, respectivamente. Una reducida población de pacientes (15%) presenta características solapadas al resto de subtipos y es tan heterogéneo que no se ha logrado determinar todas las características comunes a estos.

1.2. ETIOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA

A pesar de ser una enfermedad conocida desde hace tiempo, el primer caso clínico registrado se remonta a 1844, los principales mecanismos patogénicos han sido dilucidados en los últimos 20 años. Sin embargo, esta patología continúa siendo un completo rompecabezas para la biomedicina.

En la mayoría de los pacientes, la sintomatología está relacionada por la propia enfermedad, el tratamiento que se lleva a cabo, así como la propia genética y salud del paciente. Los síntomas más frecuentes incluyen daño óseo, anemia, fatiga, fallo renal, hipercalcemia y pérdida de peso. Ninguna de estos síntomas es característica en la mayoría de los pacientes, siendo el más incidente el daño óseo (58%).

La presencia de lesiones óseas es un síntoma destacado en los pacientes, así como dolor intenso. La medula ósea proporciona las BMSCs que se diferencian en osteoblastos, responsables de la deposición de hueso nuevo. De manera opuesta, los osteoclastos van a ser los mediadores primarios de la resorción ósea (Reagan MR *et al.*, 2015). Un desajuste en la actividad de osteoblastos u osteoclastos, tiene como consecuencia un aumento de la actividad osteolítica y el desarrollo de lesiones óseas. Los osteoclastos, pueden sobreactivarse tras interactuar con células MM y secretar IL-6, una citoquina que estimula el crecimiento de células MM, iniciando así un ciclo autodestructivo extensivo. Además, la destrucción de tejido óseo libera factores de crecimiento (TGFb1 y IGF-1) que potencian el crecimiento, progresión y supervivencia de las células MM (Abe M *et al.*, 2004).

La presencia de altos niveles de IL-6 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, de *Vascular Endothelial Growth Factor*) bloquea la diferenciación de las células supresoras de derivadas de mieloides, por lo que se produce un escenario inmunosupresivo, sin células

maduras funcionales de sistema inmune (Ramachandran I *et al.*, 2013). Esta es la causa por la que los pacientes con MM sufren complicaciones debido a infecciones, principalmente neumonía bacteriana (Amos B *et al.*, 2016).

Existen evidencias que apoyan que las células MM contribuyen a la neovascularización, aumentando la densidad microvascular del estroma. Ello se debe a la intensa secreción de VEGF, movilizándose células endoteliales. Las células endoteliales, por su parte, producen IL-6, que como ya se ha referenciado previamente, favorecen el crecimiento de células MM. Como consecuencia, el mieloma se intensifica y aumenta su agresividad.

El avance de la enfermedad va ligado a un aumento de la carga clonal. Las células plasmáticas disfuncionales se infiltran en los órganos, causando daño debido a la producción de cadenas ligeras monoclonales (Naymagon L y Abdul-Hay M, 2016). El aumento de la banda monoclonal en el torrente sanguíneo, conduce a una acumulación de la proteína en el riñón, provocando insuficiencia renal en los estadios más avanzados.

A diferencia de otras patologías, se desconoce un factor de riesgo para el MM, como ocurre por ejemplo con el tabaco en el cáncer de pulmón, que constituye una causa directa para la aparición de la enfermedad (Gómez Raposo C *et al.*, 2007).

1.3. EVOLUCIÓN CLONAL

En los últimos años, gracias a las nuevas técnicas genómicas, se han realizado estudios de secuenciación completa de exomas, hibridación genómica comparativa con arrays así como de expresión génica. Los resultados avalan una heterogeneidad intraclonal significativa para los pacientes de MM (Keats JJ *et al.*, 2012). Desde estados muy tempranos, los pacientes generan una población de subclones a partir de un único clon ancestral.

La respuesta de una terapia o la influencia de cambios epigenéticos así como el microambiente tumoral, conllevan a la adquisición de lesiones genéticas espontáneas en los distintos subclones. Como consecuencia, la enfermedad progresa debido a la competición clonal y a la supervivencia de aquel clon más apto (Magrangeas F *et al.*, 2013). Por lo tanto, un subclón infrecuente al inicio, puede emerger como el más adaptado genéticamente para al nuevo escenario, y ser lo suficientemente agresivo.

Por todo ello, detectar las anormalidades citogenéticas del paciente, y caracterizar su heterogeneidad, es un parámetro esencial para asignar un buen pronóstico. Por ejemplo, los pacientes h-MM presentan un mejor pronóstico que aquellos nh-MM, así como aquellos con un menor número de mutaciones acumuladas.

1.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El grupo de Trabajo Internacional de Mieloma (International Myeloma Working Group) propuso en 2018 una serie de criterios para el diagnóstico de MM. Este se basa en los niveles de proteína M (componente o banda monoclonal) en serum y/u orina, tasa clonal de células plasmáticas en la medula ósea y la presencia de daño en órganos (Rajkumar SV *et al.*, 2014)

En la práctica clínica, tras determinar niveles elevados de proteína M, se ha de realizar un primer proceso diagnóstico específico, el cual consiste en un aspirado de medula ósea con el objetivo de confirmar mediante citometría de flujo (CMF) la monoclonalidad de las células plasmáticas. En cuanto al estudio por CMF, se realiza un inmunofenotipo empleando marcadores de membrana específicos de células plasmáticas como son el CD138 y CD38, así como, marcadores intracelulares Ig-Kappa y Ig-Lambda los cuales determinaran la monoclonalidad de las células plasmáticas.

Además, para detectar la progresión y agresividad del cáncer, especialmente en el hueso, se realizarán pruebas de imagen como tomografías por emisión de positrones, radiografías con rayos X, imágenes por resonancia magnética y tomografías computerizadas.

1.5. MÉDULA OSEA Y MICROAMBIENTE TUMORAL

La médula ósea (del inglés *Bone Marrow*, BM) es un tipo de tejido que se encuentra en el interior de los huesos. Puede ser de dos clases: roja y amarilla. En la BM roja se fabrican las células de la sangre. Este proceso de fabricación se denomina hematopoyesis o hemopoyesis. La BM amarillase compone de grasa y no participa en la formación de la sangre. La BM, en los adultos, está ubicada en las costillas, el esternón, la columna vertebral, el cráneo, la escápula y la pelvis. La BM mantiene el número normal de los tres tipos de células sanguíneas, sustituyendo a las antiguas, que sufren muerte natural. Además, si necesitara aumentar el número de ellas, por cualquier motivo, la médula formaría con rapidez nuevas células (Morrison SJ *et al.*, 2014)

El microambiente medular se dice que es complejo y heterogéneo debido a que cohabitan células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, junto con un compartimento extracelular conformado por la matriz extracelular (ECM del inglés, *Extracellular Matrix*), citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y exomas (Kawano Y *et al.*, 2015). Dicho compartimento presenta una arquitectura compuesta por sub-microentornos, llamados nichos, envueltos en una capa protectora de hueso mineralizado. El balance entre estos compartimentos diferentes está profundamente afectado en el mieloma múltiple. Entre las células hematopoyéticas podemos encontrar células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC), células precursoras y progenitoras (tanto mesenquimales como hematopoyéticas), células inmunes (natural killers (NK), macrófagos, linfocitos), eritrocitos, megacariocitos y plaquetas. Por otra parte, entre las no hematopoyéticas, células endoteliales, fibroblastos/células madre estromales de medula ósea (BMSCs del inglés, *Bone Marrow Stem Cells*), así como condroclastos, osteoclastos y osteoblastos.

Por tanto, la interacción funcional entre los nichos de BM afecta a numerosos procesos fisiológicos debido al gran número de células en la BM. Destaca la regulación de la

hematopoyesis, la movilización de células sanguíneas al torrente sanguíneo y al desplazamiento de células maduras a sitios concretos dentro de la BM.

En resumen, las interacciones bidireccionales entre otras células, directa o indirectamente, o entre células y ECM, dentro del líquido medio del nicho son requerimientos fundamentales para la patogénesis del MM, el crecimiento de células MM, la supervivencia, migración e incluso resistencia a fármacos. Además, se ha demostrado que dicha disrupción de homeostasis en la medula ósea es inducida por las células plasmáticas de MM.

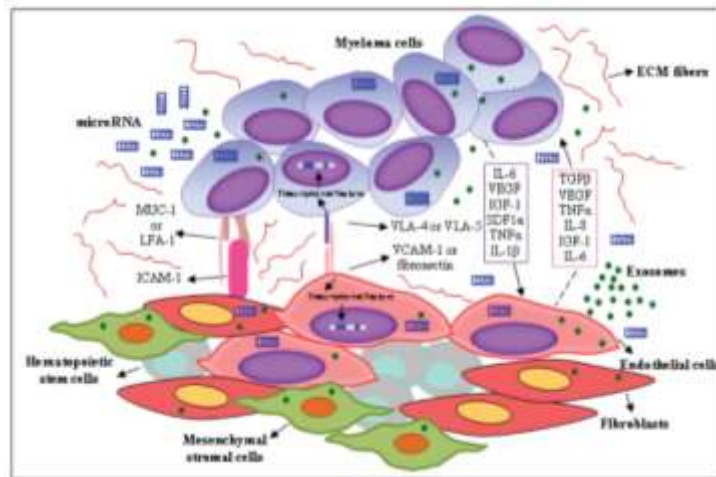


Figura 1: Esquema de la interacción bidireccional de las células MM con BM (Di Marzo L et al., 2016)

1.5.1. Compartimento no celular e importancia en el desarrollo de resistencia a fármacos

El compartimento no celular de la BM está compuesto por una ECM con ácido hialurónico (HA), elastina y colágeno principalmente, además de otras biomoléculas como fibronectina, laminina, osteopontina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y el líquido medio. Este último, compuesto por factores como citoquinas y factores de crecimiento.

Los tres componentes principales, HA, elastina y colágeno, confieren nutrición y cohesión al tejido. Además, también pueden interactuar con las células del MM, y aunque no hay ningún estudio que lo avale, su presencia en el microentorno tumoral parece ser relevante para la proliferación de estas.

Un estudio en 1998 por Kibler *et al* (1998), demostró la importancia de moléculas de la ECM como la laminina, el colágeno tipo VI y la fibronectina, en la adhesión de la línea células U226, IM-9 y OPM-2. Además, se sugirió que para que las células se uniesen a colágeno tipo VI, era necesaria la presencia de un proteoglicano, el heparán sulfato. Destaca su importancia por ser uno de los primeros artículos bibliográficos en el que se aportan datos acerca de la importancia de la ECM sobre líneas celulares tumorales de MM. Es más, dichas adhesiones justifican, en parte, que las células MM, habiten prácticamente de manera exclusiva, la medula ósea.

La adhesión de las células MM a fibronectina mediadas por la integrina $\beta 1$, protegen directamente a la célula tumoral del daño a DNA por fármacos. Se produce un arresto reversible en G1 asociado a un aumento de los niveles de p27kip1 (Hazlehurst LA *et al.*, 2000). En otros casos, la adhesión a vitronectina y fibronectina esta predominantemente mediada por una integrina ($\alpha v\beta 3$), la cual aumenta la producción y liberación de MMP-2 y MMP-9 (metaloproteinasas de matriz extracelular, MMP), dos activadores plasminógenos que promueven la invasión y expansión de células tumorales (Vacca A *et al.*, 2001).

Dicho esto, se están llevando a cabo numerosos estudios evaluando el efecto de cada componente biomolecular de la matriz, pues de un modo u otro, tiene una relevancia en la evolución del MM. Conocer el efecto de la interacción de cada una de ellas con las células de la BM nos ofrecería un alto poder para inducir sensibilidad o superar la resistencia a terapias actuales.

1.5.2. Colágeno y ácido hialurónico en la matriz extracelular

El colágeno es una proteína triple hélice, presente en todos los tejidos conectivos y constituye el componente estructural más abundante. Existen 29 tipos de colágeno, siendo el colágeno tipo I (Col I) el más empleado en ingeniería tisular (Chattopadhyay S y Raines RT, 2014). Destaca por ser biodegradable y por la adhesión celular directa o indirecta a esta proteína. El HA, es un glicosaminoglicano común de ECM de cartílago y de tejido conectivo. Ha sido empleado para hidrogeles que mimeticen la ECM tumoral *in vitro* e inducir angiogénesis (Serban MA *et al.*, 2008)

El colágeno y el HA son dos componentes estructurales y funcionales indispensables en la ECM, y por tanto, con roles en el desarrollo de MM. De hecho, dichas biomoléculas y su adhesión a células de la médula ósea origina una activación de rutas de resistencia a fármacos (Vincent y Mechti 2005). Además, son multitud los estudios que apuntan a que la realmente nos hemos de referir a ello como una multirresistencia a fármacos.

La sinergia entre estas dos biomoléculas, colágeno y HA, junto con quitosano ya fue planteada en un estudio en el que se evaluaba la diferenciación ontogénica de BMSCs y demostrada su efecto en dicho proceso (Mathews, S *et al.*, 2011). Posteriormente, en 2017, Haiyong Ao *et al.* replantearon la sinergia de ambas biomoléculas en células madre mesenquimales, demostrando una mejor adhesión celular, proliferación y diferenciación *in vitro* e *in vivo* con ambas. Resultados que pueden ser extrapolables a la BM de pacientes con MM.

El HA antagoniza la apoptosis inducida por el fármaco dexametasona e induce la supervivencia de células plasmáticas de línea celular de MM, debido a que promueve una mayor actividad autocrina de diferentes citoquinas (interleuquina-6, IL-6) y factores de crecimientos. En el caso de la línea RPMI8226, independiente para IL-6, el efecto de HA de supervivencia se media a través de otras rutas (activación de Nf-Kb), con resultados similares (Vincent T *et al.*, 2003). En el caso de otro fármaco, la lenalidomida, las células resistentes a este son aquellas con sobreexpresión de CD44 con unión a HA.

Por otro lado, se ha relacionado una disminución de Col I en pacientes con estadios avanzados de MM y altos niveles de esta proteína en estadios tempranos de la enfermedad, presentando el Col I un rol en la evolución de la enfermedad (Tancred, T *et al.*, 2008).

1.6. REVISIÓN DE LAS ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS: PASADO Y ACTUALIDAD

El mieloma múltiple es una enfermedad considerada incurable a pesar de tratamientos con altas dosis de quimioterapia, trasplantes de células madre autólogas y nuevos agentes emergente. En la última década, el panorama de tratamientos ha sufrido enormes transformaciones. Particularmente, los anticuerpos monoclonales han cambiado el rumbo de las terapias y lo cierto es que los tratamientos más apropiados, generalmente, suelen ser la combinación de éstos con otras terapias.

Para comprender las dianas de algunos fármacos se requiere una revisión previa las rutas que regulan la homeostasis celular, mecanismos moleculares que determinan el MM activo. Destaca la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, de *Unfolded Protein Response*) en el retículo endoplasmático (RE), puesta en marcha en situaciones de estrés (Schröder M y Kaufman RJ, 2005). Las células MM dependen fuertemente de dicha ruta debido a las grandes cantidades producidas de paraproteína. Por tanto, para evitar tal acumulación de paraproteína, se han propuesto fármacos como bortezomib, inhibidores de proteosoma (Adams J, 2004; Lawasut P *et al.*, 2012). Este fármaco supuso un punto de inflexión al aumentar la tasa de supervivencia. Sin embargo, los pacientes sometidos a dichos tratamientos presentan un inicio efectivo y efímero, desarrollando con el tiempo resistencia al fármaco y recayendo en MM (Kumar SK *et al.*, 2008)

En los últimos años se han aprobado la segunda generación de inhibidores de proteosomas (carfilzomib y ixazomib), siendo destacable la combinación carfilzomib y dexametasona. Por último, destacar los agentes inmunomoduladores, pomalidomida, los anticuerpos monoclonales (mAbs), elotuzumab y daratumimab, y por último, el inhibidor histona deacetilasa, paobinostat.

A pesar de los últimos avances, la gran frontera para encontrar una terapia efectiva es la heterogeneidad clonal encontrada en los pacientes. Lo cierto es que el empleo de tratamientos subóptimos conlleva la erradicación de subclones sensibles permitiendo la expansión de clones resistentes (Keats JJ *et al.*, 2012). Por ello, se propone el empleo conjuntos de distintas clases de fármacos subóptimos y sinérgicos entre ellos, como tratamiento óptimo para eliminar un mayor número de subclones, reducir el riesgo de desarrollar una resistencia a fármacos y una respuesta exponencialmente superior. Tal y como así abalan los datos de ensayos preclínicos y clínicos (Stewart AK *et al.*, 2015). Sin embargo, el estado de salud será determinante para emplear una estrategia agresiva, así como si el paciente ha sido recientemente diagnosticado o se encuentra en una situación de recaída (Fraz MA *et al.*, 2019). El balance, toxicidad y eficacia, ha de estar presente en todo momento, en una enfermedad tan heterogénea y compleja. Una vez más, todo apunta a la necesidad de abordajes individualizados para tomar la mejor decisión.

El conjunto de terapias desarrolladas y enumeradas previamente, tienen como diana las distintas vulnerabilidades de las células de mieloma en lugar de dirigir fármacos a los marcadores genéticos específicos de cada subtipo de pacientes o a las rutas anómalas.

En un futuro, con el desarrollo de fármacos más precisos e individualizados a cada subtipo podremos clasificar en base a factores predictivos. Por tanto, se podrán establecer protocolos de actuación para cada subtipo y seguir la línea de tratamientos más adecuada para el paciente. Así pues, dicho valor predictivo decidirá si es conveniente emplear un solo agente terapéutico o si por el contrario, la combinación de varios agentes.

1.7. MODELOS DE MIELOMA MÚLTIPLE TRIDIMENSIONALES

1.7.1. 2D VS 3D

La mayoría de avances y desarrollo del conocimiento en el campo de la biología del cáncer y el descubrimiento de fármacos ha sido desarrollado en cultivos convencionales (2D) de líneas celulares. La gran limitación de éstos es la incapacidad de recrear la compleja red tridimensional en la que interaccionan las células primarias tumorales de pacientes de MM con los distintos componentes de la médula ósea (Zhang, W *et al.*, 2016). Ello simplifica el escenario real en el que se desarrolla el cáncer. Por lo tanto, no es de extrañar que haya un gran número de fármacos que son testeados en modelos *in vitro* no representativos del MM y fracasen en futuros ensayos clínicos. Un último dato avala el fracaso en los modelos empleados actuales, en los que un 40% de los pacientes recién diagnosticados no responde a la terapia y un 90% desarrolla resistencia a fármacos. (de la Puente P, 2014). Los fármacos aprobados en cultivos 2D no son eficaces.

Un modelo *in vitro* óptimo ha de mantener y facilitar el correcto crecimiento de las células primarias tumorales, además de recrear un microentorno mimético para que el perfil genómico de éstas, así como su fisiología, sea idéntico al de unas células en su microambiente tumoral.

En un microambiente celular destacan las señales mecánicas y bioquímicas y las interacciones de adhesión entre célula-célula y célula-ECM. Tanto si se desea recrear un escenario tumoral como una situación con células sanas, será necesario facilitar dichas conexiones, imposibles de representar en un modelo 2D simplificado (Mitsiades CS *et al.*, 2007). Además, en un cáncer como el mieloma múltiple es de vital importancia mantener las señales del estroma, involucradas en conferir la resistencia a fármacos al tumor. Se han de tener en consideración los gradientes de penetración del fármaco en el estroma y su perfil hipóxico, limitados a un modelo dinámico (Zhang W *et al.*, 2016).

Por todo ello, actualmente todos los esfuerzos están siendo destinados a desarrollar modelos 3D dinámicos para el cultivo *ex vivo* de células primarias.

1.7.2. Ingeniería tisular y soportes 3D

La ingeniería tisular (IT) se definió en 1988 por los asistentes del NSF (*National Science Foundation*). Con este término se conoce al campo de la medicina regenerativa o terapia celular y es una rama de la bioingeniería encargada de la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica con el fin de mejorar o reemplazar funciones biológicas.

Esta rama de la ciencia permite la creación de estructuras tisulares complejas a una escala deseada, pudiendo generar modelos 3D como los soportes macro-porosos o *scaffolds*, hidrogeles y esponjas. Estos soportes pueden ser empleados independientemente o combinados con moléculas bioactivas o geles, así como cultivarse con células. Los biomateriales más destacados son los derivados de polímeros naturales, los sintéticos, los materiales inorgánicos bioabsorbibles e híbridos de los ya mencionados, así como tejidos descelularizados. (Pina S *et al.*, 2019)

En cuanto a mimetizar el microambiente de medula ósea, se han desarrollado diversos modelos 3D. Los más destacados y optimizados se basan en hidrogeles. Un hidrogel es un polímero hidrófilo con propiedades fisicoquímicas particulares que le confiere una estructura de red tridimensional de cadenas flexibles (Cushing y Anseth 2007). Los hidrogeles bioactivos y de respuesta celular han sido empleados en ingeniería tisular para el cartílago articular, cornea, piel, tendón y tejidos vasculares, por su gran similitud a matrices extracelulares y su durabilidad (Barry *et al.* 2009).

El grupo de investigación, dirigido por Pilar de la Puente (de la Puente P *et al.*, 2015) concluye que son adecuados para proliferación de células MM, recrear las interacciones con el entorno, recrear los gradientes del nicho y lo más importante, inducen resistencia a las células MM. Sin embargo, tras un análisis detallado de su trabajo, hemos encontrado una limitación a considerar, las células carecen de libertad de movimiento. Por tanto, los resultados derivados han de servir para justificar el uso de modelos 3D para el cultivo de células de MM y nunca, tal y como se menciona en el trabajo, para testar fármacos o para terapias personalizadas. Asimismo, otro grupo de investigación paralelamente ha sido capaz de optimizar un scaffold de gelatina y realizar un cultivo 3D junto con un biorreactor. Dicho avance, desarrollado por Ferrarini y colaboradores (Belloni D *et al.*, 2018), supone una plataforma útil y novedosa para estudiar la interacción molecular estroma-tumor

Para un mayor control espaciotemporal de un cultivo 3D representativo de un microambiente, es preferible un microgel. Un microgel engloba un conjunto de partículas dispersas con comportamientos coloidales propios. Existen evidencias previas que apoyan el empleo de micropartículas poliméricas como soportes para la expansión y diferenciación celular. Los microgeles promueven una mayor proliferación celular que los soportes tradicionales. Además, con un biopolímero adecuado se puede recrear el mismo microambiente húmedo, característico de la medula ósea. Así como, optimizar la densidad del microgel para que se asemeje a la medula ósea, siempre propiciando libertad a las células, para desplazarse e interactuar con fluidez. (Zhou W *et al.*, 2016)

1.8. ALGINATO COMO BIOMATERIAL

El alginato es un componente de la pared celular de las algas pardas (*Phaeophyceae*). Su función biológica en las algas consiste en permitir la formación de una estructura intracelular cuya matriz de gel le confiere resistencia mecánica y flexibilidad. Destaca su capacidad para retener agua, sus propiedades gelificantes, su acción espesante y estabilizante por lo que es ampliamente empleado industrialmente, entre ellas la farmacéutica y alimentaria. Los alginatos son considerados hidrocoloides debido a su afinidad por el agua y propiedades reológicas.

Estructuralmente, el alginato es un polisacárido lineal aniónico conformado por ácido alfa-L-gulurónico y el ácido beta-D-manurónico. Dependiendo del contenido de cada monómero, así como la distribución de estos, tendremos un gel flexible (alto contenido en manurónico) o un gel con mayor capacidad de unión a calcio, y por tanto, consistente y rígido. Las propiedades mecánicas dependen de la densidad de polímero (Cai K *et al.*, 2007),

Además de ser un polímero natural, ha sido empleado en IT previamente por su biocompatibilidad, y en clínica, constituye un biopolímero de elección preferente (Reakasame S *et al.*, 2018). Presenta una estructura similar a la matriz extracelular creando un microambiente húmedo. Es relativamente económico y como se muestra a continuación, fácil de manipular y solidificar.

El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio), de los cuales el ion calcio es el más empleado. El ion calcio se difunde en la solución de sal de alginato hasta unirse a la cadena polimérica, ocasionando un reordenamiento estructural resultando en un material sólido (Kaklamani G *et al.*, 2014). Su preparación es en frío a diferencia de otros polisacáridos gelificantes. Además, los geles son termoirreversibles tras su rápida gelificación. Sin embargo, están sujetos a procesos de degradación química como un tratamiento prolongado a pH bajo o alto puede desestabilizar el gel.

Una aplicación muy estudiada y con alto aporte de artículos bibliográficos es el encapsulamiento de fármacos, macromoléculas o células en el interior de microesferas de alginato (Tønnesen H *et al.*, 2002). Esto es posible porque se puede gelificar externa o internamente con sales de calcio. Generalmente, la gota se forma por emulsión y posteriormente, gelifica externamente al precipitar a una solución salina de cloruro cálcico (CaCl_2) en agitación.

1.9. MICROFLUÍDICA Y APLICACIÓN PARA PRODUCIR MICROGELES

La microfluídica es, básicamente, la mecánica de fluidos a tamaño micrométrico. Se define como la ciencia que estudia los sistemas para manipular cantidades muy pequeñas de fluido (10^{-6} a 10^{-19} litros), empleando canales con dimensiones desde unas cuantas micras hasta cientos de micras. Las dimensiones de los canales limitan el sistema, y en los últimos años, se ha propuesto la fabricación del molde con impresoras 3D.

Los dispositivos microfluídicos se consideran óptimos para diversas aplicaciones biológicas, destacando principalmente su capacidad de control sobre todas las variables experimentales. Dicho control está justificado por el flujo laminar (generalmente con el número de Reynolds menor a 100) y sus reducidas dimensiones. Se debe tener en cuenta que la gravedad y la inercia no tienen mucha relevancia, en contraposición a la tensión superficial, viscosidad y las fuerzas electrostáticas.

Entre sus aplicaciones en la rama de la biotecnología, destaca: su uso para el cultivo de células recreando un microentorno óptimo través de los flujos de los fluidos, la encapsulación de células o de moléculas bioactivas para terapias dirigidas y eficientes, y la generación de poblaciones de micro y nanopartículas de polímeros de interés para multitud de industrias. (Gonzalez C *et al.*, 2013)

Respecto a la formación de partículas de tamaño determinado, convencionalmente se generaban mediante técnicas de polimerización (Utech S *et al.*, 2015). Los dispositivos flow focussing son capaces de generar poblaciones monodispersas de partículas de tamaños deseados de una manera reproducible, rápida y económica. De manera simplificada, se puede afirmar que dos flujos convergen de forma coaxial, siendo el fluido de la fase dispersa rodeada

y confinado por el fluido de la fase continua. Cuando los dos fluidos son inmiscibles se genera una gota de tamaño concreto, dimensión que será determinada por el caudal de los fluidos y las dimensiones de los canales del dispositivo (Seiffert S, 2012).

Con todo ello, la microfluídica es una alternativa actual a lo formaciones de microesferas mediante técnicas convencionales de polimerización, las cuales generan poblaciones heterogéneas, son costosas en tiempo y están limitadas por el bajo control en la elección de tamaño.

2. OBJETIVOS

El siguiente Trabajo de Fin de Grado se enmarca dentro del Proyecto Prometeo, financiado por la Unión Europea y que se desarrolla en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular en colaboración con el Hospital La Fe. El fin común es generar un modelo *in vitro* del mieloma múltiple, de modo que la respuesta a fármacos de las células primarias de MM sea lo más similar a *in vivo*. Ello supondría una vía potente para una medicina de precisión y una mejora en las líneas terapéuticas.

Dicho esto, en el siguiente trabajo nos hemos centrado en recrear el microambiente tumoral con dos de las biomoléculas principales en el ECM, como son el ácido hialurónico y el colágeno. Proponemos un microgel producido mediante microfluídica y funcionalizado por el método Layer-by-Layer. El soporte tridimensional, de un biopolímero natural biocompatible y húmedo como es el alginato, será cultivado con un único tipo celular, las células plasmáticas.

Con nuestra propuesta pretendemos:

1. Demostrar la monodispersión y control de producción dados por un dispositivo de microfluídica
2. Desarrollar un protocolo de funcionalización óptimo para nuestras biomoléculas y las microesferas de alginato
3. Caracterizar la línea celular RPMI8226 mediante citometría de flujo
4. Realizar un cultivo 3D basado en microgel
5. Corroborar la importancia de los cultivos 3D para recrear un microambiente tumoral, comparándolo con un cultivo sin soporte biomaterial.
6. Dilucidar la influencia del ácido hialurónico y el colágeno en la proliferación de las células MM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO

3.1.1. Fluidos empleados

La fase dispersa empleada ha sido el alginato sódico (Alg). La solución de alginato de sodio (Sigma-Aldrich Corporation, Cat 180827) se preparó a una concentración del 1.5% p/v, en agua Ultra Pura (UP). Se mantuvo en agitación magnética durante 1h a 40°C, hasta que se observó una solución homogénea.

Para producir microgotas de alginato sódico, era necesario un fluido inmisible como fase continua. Se evaluaron el aceite de oliva virgen extra y un disolvente orgánico, el cloroformo grado de síntesis, estabilizado con etanol (Sigma-Aldrich Corporation, Cat 51976)

3.1.2. Descripción del sistema de microfluídica.

El sistema *flow-focusing*, es capaz de generar microgotas de diversos tamaños modificando los flujos de alginato de sodio y cloroformo. Todas las microgotas generadas por emulsión son arrastradas por el flujo de cloroformo, sin interactuar entre ellas. La eficacia de producción de microesferas del tamaño esperado es muy alta. Se puede afirmar que es un método de producción robusto, reproducible y autónomo y en el presente estudio, evaluaremos si lo es para los fluidos mencionados.

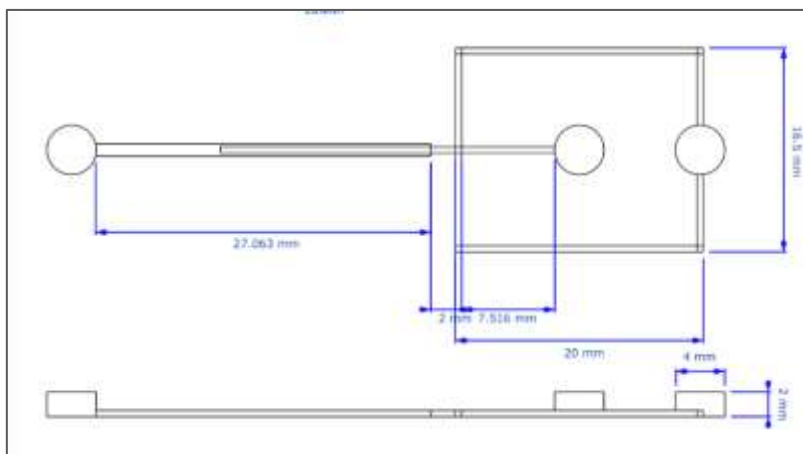


Figura 2: Diseño detallado del sistema *flow-focusing*, donde se puede ver la geometría de los canales del sistema así como las dimensiones del dispositivo de microfluídica.

Los canales del sistema están diseñados con herramientas de moldeado digital y siguen los patrones mostrados en la *Figura 2*. En primer lugar, se construyó una plantilla de los canales utilizando una impresora 3D (Prusa I3MK3), depositando un filamento de ácido poliláctico (PLA) sobre un soporte de cristal. La sección del canal es aproximadamente rectangular con unas dimensiones de 16.5mm x 48.56mm. El circuito de microfluídica se realizó con

poli(dimetil siloxano) (PDMS) (Sigma-Aldrich Corporation, Cat 481939), el precursor del polímero se vertió en un molde en cuyo fondo se situó la plantilla impresa. La polimerización del PDMS se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador. El circuito de PDMS se separó fácilmente de la plantilla, quedando los canales grabados en una lámina de PDMS. A continuación, se hicieron agujeros para conectar los tubos, y se pegó sobre una lámina de cristal mediante un tratamiento de plasma. El PDMS es inerte para todos los disolventes empleados algo que es fundamental en el correcto funcionamiento del circuito. Además, para los tubos de salida y entrada se emplearon tubos de teflón de 10 cm de longitud y con 1.6mm y 0.5mm diámetros externo e interno respectivamente (véase el resultado en la *Figura 3*)

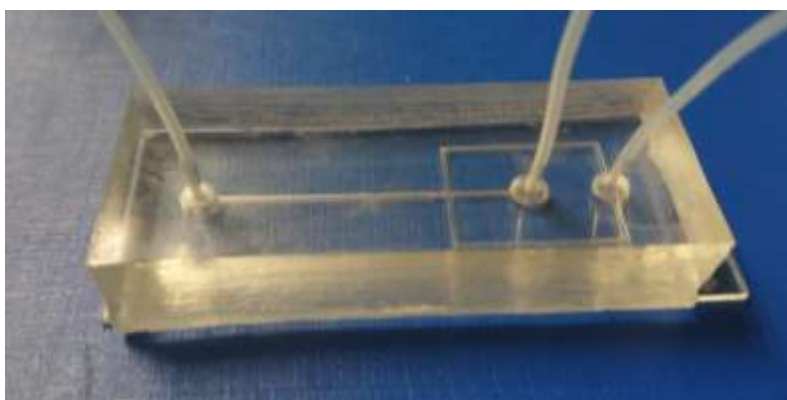


Figura 3: Dispositivo preparado para su uso, de izda a dcha: tubo de salida, tubo entrada de fase dispersa, tubo de entrada de fase continua

3.1.3. Obtención de microesferas de alginato

En primer lugar, preparamos una solución de cloruro cálcico anhídrido puro (Scharlab S.L., Cat. 34961-0250) al 10% p/v en un matraz de 1000mL. Pesamos 75g en una balanza analítica de precisión y diluimos en 750mL en agua UP en agitación magnética constante durante 10 minutos (min). También se preparará una solución de alginato sódico tal como se menciona en el apartado 4.1.1.

Seguidamente, en una cabina de extracción se prepararon dos bombas de inyección de precisión, para regular el flujo de cada fluido independientemente. Las jeringas empleadas fueron de 20mL para el alginato y de 60mL para el cloroformo (Clf). Para cargar la jeringa de este último, la botella del mismo se abrió en cabina de extracción por medidas de seguridad, donde en todo momento se trabajó con una máscara de gases. Respecto a las jeringas, nos aseguramos de que no queden burbujas tras ser cargadas con cada fluido, pues causan inestabilidad no deseada en el sistema.

Las bombas (Harvard Apparatus PHD/ ULTRA) son configuradas para los flujos deseados y montamos el dispositivo de microfluídica con dos tubos de entrada, los cuales son conectados a las jeringas correspondientes, y un tubo de salida. Dejamos funcionando el sistema durante 1 min para que se estabilice con los flujos establecidos en cada bomba. Se puede observar la formación de microesferas dentro del dispositivo.

El matraz con solución de CaCl_2 se introdujo en el interior de la cabina de extracción, y se mantuvo en agitación magnética vigorosa (700rpm si el volumen es de 750mL). El tubo de salida se coloca en el interior de la solución de calcio, pues hará de baño externo de gelificación. De este modo, la gelificación de las microesferas se produce instantáneamente a la salida del tubo y se evitan aglomeraciones en la gota de cloroformo durante la caída.

Una vez detenidas las bombas, se deja en agitación durante 30 min para asegurarnos de su total gelificación. Al ser porosas las microesferas, el cloroformo residual se evaporará en ese tiempo. Por último, son tamizadas con un tamiz de $70\ \mu\text{m}$ y lavadas sucesivamente con etanol. Posteriormente son guardadas en un tubo Falcon de 15mL en una solución 70%EtOH, a temperatura ambiente.

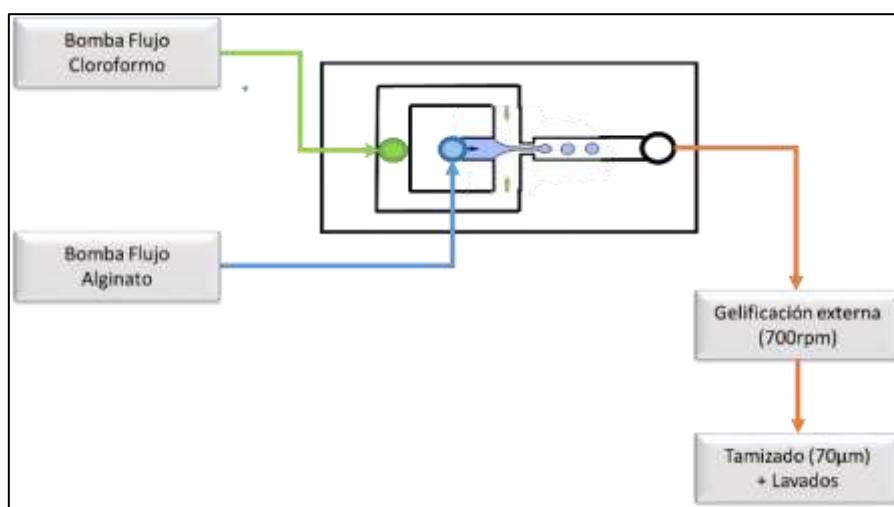


Figura 4: Esquema simplificado del proceso de producción de microesferas, donde se puede observar la producción de la microgota de alginato, así como los pasos posteriores de gelificación y recolección de microesferas producidas.

3.1.4. Cuidado del dispositivo

Tras cada uso, el dispositivo fue lavado con acetona con la ayuda de jeringas. Posteriormente, se secaron haciendo circular aire a presión. En el caso en el que se encontró un tapón de polímero, se procedió a rellenar todo el dispositivo con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5M (Sigma Aldrich Corporation, Cat 20-158), cargado en una jeringa. Tras 10 min, se realizó un lavado con agua UP y el dispositivo quedó limpio. Resulta esencial la absoluta limpieza de los canales del dispositivo para mantener su eficacia.

3.2.FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS CON COLÁGENO Y ÁCIDO HIALURÓNICO

La técnica elegida para funcionalizar las microesferas fue la de un autoensamblaje electrostático por Layer-by-Layer (LbL), óptimo para recubrimientos con biomoléculas al trabajar en una solución acuosa. La diferencia de carga eléctrica de los grupos funcionales de cada

recubrimiento secuencial conduce al autoensamblaje, previamente mencionado. El proceso se realiza a pH5 porque el alginato queda cargado negativamente; el colágeno, positivamente; y el hialurónico, negativamente. Este protocolo se basa en el desarrollado en 2013, por *Zhao MY* y colaboradores.



Figura 5: Esquema gráfico de la funcionalización de las microesferas de alginato mediante Lbl

En primer lugar, se prepararon las soluciones de las dos biomoléculas de interés. El colágeno tipo I, a 3mg/mL (Advanced BioMatrix, Cat 5005) fue diluido a 1mg/mL con agua UP. El HA de sal sódica de *Streptococcus equi* (Sigma Aldrich Corporation, Cat 53747-10G), disuelto en agua UP a una concentración de 1mg/ML. Ambas fueron equilibradas a pH5 con un tampón HEPES (Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico)(Sigma Aldrich Corporation, Cat 83264). Además, para los lavados entre cada deposición, preparamos 100mL de agua UP a pH5. El HA, debido a su alto peso molecular, es preferible usarlo 24h tras su preparación en nevera a 4°C.

El proceso de recubrimiento, ha de realizarse en condiciones de agitación para aumentar los contactos entre moléculas y por tanto, las interacciones electrostáticas. Concretamente, fue realizado a una agitación de 600rpm. Las microesferas empleadas, estaban almacenadas en etanol 70 v/v, por lo que se realizan dos lavados sucesivos agua UP (pH5) de 5 minutos cada uno. Seguidamente, las microesferas fueron sumergidas en la solución de Col I durante 20min, seguidas de un lavado rápido de agua UP. Después, las microesferas fueron sumergidas en la solución de HA durante 15min, seguidas de nuevo por otro lavado. Repitiendo estos pasos, se depositaron multitud de capas sobre las microesferas. Concretamente, se obtuvo una población de microesferas funcionalizadas con 7 capas y otra, de 8 capas.

Posteriormente, las microesferas fueron conservadas en nevera a 4°C en agua UP a pH 5, tras retirar toda la solución posible y siempre obteniendo la mitad de la población de microesferas acabada en HA y la otra mitad en Col I.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO

3.3.1. Estudio de la influencia de los flujos de medio continuo y disperso sobre el tamaño de las microesferas

El sistema de microfluídica propuesto no había sido empleado antes con fases continuas y dispersas como las propuestas en este trabajo. Por ello, es importante conocer la influencia de cada flujo en el tamaño de partícula. Para evaluar el control de tamaño de microesferas proporcionados por nuestro dispositivo de microfluídica, se diseñó un experimento con 3 flujos

de fase continua y 3 flujos de fase dispersa. Cada una de las 9 posibles combinaciones (*Tabla 1*) fue recogida durante 4 minutos, tras una estabilización de los flujos previa.

Tabla 1: Condiciones propuestas para estudiar la influencia de los flujos de medio continuo y disperso sobre el tamaño de partícula.

	Fase continua (Clf) (ml/min)	Fase dispersa (Alg) (ml/min)
Condición 1	0.3	0.03
Condición 2	1.3	0.03
Condición 3	3	0.03
Condición 4	0.3	0.13
Condición 5	1.3	0.13
Condición 6	3	0.13
Condición 7	0.3	0.3
Condición 8	1.3	0.3
Condición 9	3	0.3

En la lupa binocular LEICA MZ APO, tomamos imágenes de cada una de las condiciones a 8X. Tras ello y con el software ImageJ, se anotó el diámetro de una población aleatoria de 50 microesferas por cada condición con la función 'Analizar partículas'. Se considera importante el estudio de la monodispersión y para ello, se ha optado por la representación de los datos en forma de histogramas, para comprobar si la distribución de tamaño es homogénea y como se espera, próxima a una distribución normal.

Se consideró oportuno repetir el experimento realizado ampliando el intervalo de flujos del medio continuo para un flujo de 0.13 ml/min de medio disperso, que fue el que permitió obtener los mejores resultados. El rango de flujos de cloroformo propuesto abarcó, en este segundo estudio, de 0.3 a 6.2 mL/min (véanse condiciones en *Tabla 2*)

Por último, los resultados permitirán determinar cuál es la condición óptima para la generación de un microgel. Además se realizara un análisis de distribución de tamaños con una población N=245 para dicha condición.

Tabla 2: Condiciones para el segundo estudio de la influencia de los flujos en el tamaño de partícula obtenido.

	Fase continua (Clf) (ml/min)	Fase dispersa (Alg) (ml/min)
Condición A	0.3	0.13
Condición B	1.3	0.13
Condición C	3	0.13
Condición D	5	0.13
Condición E	6.2	0.13

3.3.2. Evaluación del rendimiento del proceso de producción

De acuerdo a la futura aplicación de las microesferas producidas, se consideró relevante valorar el rendimiento para elegir la condición óptima de producción de microesferas.

El rendimiento del proceso de producción de microesferas se evaluó con las muestras de cada condición secas en campana de extracción durante 3 días, y posterior pesado en balanza analítica de precisión (METTLER TOLEDO, ME54E) con una resolución de 0.1mg. El peso es una medida relativa del rendimiento de cada condición. Para asegurarnos resultados fiables, se evaluaron 3 réplicas por cada condición.

3.3.3. Caracterización morfológica mediante FESEM

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), facilitado por el Servicio de Microscopia Electrónica de la UPV, es un instrumento que ofrece información sobre la superficie con una altísima resolución. Se empleó el modelo ULTRA 55 de la marca ZEISS. Las condiciones de uso del instrumento fueron 800v para ESB Grid, distancia de trabajo a 3.7mm, EHT 2KV y con un detector de electrones secundarios SE2. Se aplicaron aumentos entre 36 y 78000 X. Además de ver la superficie, nos permite ver la morfología de las microesferas y su tamaño de manera muy precisa.

Las muestras en este instrumento han de estar secas. Debido al gran porcentaje de agua que contienen las microesferas, no fue posible un secado por liofilización debido a la pérdida de su morfología real. Por tanto, desarrollamos un protocolo para la deshidratación de las mismas.

3.3.3.1. Preparación de muestras para el FESEM

Se procedió a la fijación con una solución de glutaraldehído (Sigma Aldrich Corporation, Cat G5882) al 3% v/v en agua UP. Las muestras se fijaron durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate-buffered saline*) para limpiar cualquier resto de glutaraldehído. Posteriormente, la muestra se sumergió durante 10 minutos en soluciones de 30,50,70,80,90,95,100,100,100% Etanol v/v en agua UP. De este modo, el agua de las muestras se sustituye por etanol.

Una vez hecho esto, se extrajo el disolvente en un secador por punto crítico LEICA CPD300. El programa seleccionado constaba de un influjo de CO₂ a velocidad media con 120s de retraso para el proceso de intercambio. Dicho procedimiento se repitió durante 14 ciclos. La velocidad de calentamiento para el punto crítico fue lenta con posterior salida lenta de gas. Las muestras se visualizaron inmediatamente en el FESEM para evitar una rehidratación ambiental.

3.3.4. Caracterización de los recubrimientos de Layer-by-Layer

3.3.4.1. Ensayo BCA. Cuantificación de colágeno

El ensayo de ácido bicinconínico (BCA) permite la cuantificación de proteínas de manera indirecta. Está basado en la detección espectrofotométrica a 562nm de Cu^{2+} reducido, tras una reacción de conversión de Cu^{2+} a Cu^{1+} dependiente de temperatura (37°C) en presencia de un reactivo cromogénico específico. Se siguió el protocolo indicado en el kit de microBCA (Thermo Fisher Scientific™, Cat 23235) y se realizó una curva patrón con colágeno. Elegimos este método por su alta sensibilidad y su amplio rango de concentraciones. Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas con VICTOR3 V 1420 *Multilabel Plate Counter*.

Se evalúan muestras de cada capa funcionalizada, así como muestras control. El objetivo de realizar dicho ensayo es cuantificar el colágeno unido a las microesferas durante el proceso de funcionalización y observar un aumento del mismo proporcional al número de capas de colágeno. Se incluyen en este ensayo las microesferas acabadas en capa de hialurónico, de modo que han de tener valores de colágeno similares a las microesferas previas. Si esta hipótesis se cumple, quedaría demostrado el proceso de funcionalización de Layer-by-Layer.

3.3.4.2. Identificación de colágeno y hialurónico mediante FTIR

La técnica FTIR se basa en la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. La señal resultante de la radiación es un espectro que representa la 'huella' molecular de una muestra. Esta técnica, a nivel cualitativo, nos permite confirmar por segunda vez, la eficacia del protocolo de funcionalización propuesto. Se esperan observar diferencias estructurales en aquellas microesferas no funcionalizadas con respecto a las funcionalizadas con colágeno y ácido hialurónico. El equipo empleado, BRUKER ALPHA PLATINUM ATR.

Los espectros generados con el software OPUS fueron convertidos a formato .txt para ser leídos por el software Excel, donde se graficaron los espectros de cada muestra: microesferas sin funcionalizar, microesferas con una última capa de colágeno y microesferas con una última capa de hialurónico.

3.4. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LA LÍNEA CELULAR RPMI 8226

La línea celular RPMI8226 procedente de la Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC) corresponde a células humanas de mieloma derivadas de un hombre adulto de 61 años. Para constatar dicha información, decidimos realizar un inmunofenotipo de la línea celular mediante CMF. Para ello, empleamos la siguiente combinación de 10 anticuerpos monoclonales frente a antígenos de membrana: CD45 conjugado con el fluoróforo 6,8-difluoro-7-hidroxycumarina (Pacific Blue), CD138 conjugado con Horizon Violet500 (HV500), CD38 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD56 conjugado con ficoeritrina (PE), CD27 conjugado con proteína clorofila peridina-R-ficoeritrina cianina (PerCP-Cy5.5), CD19 conjugado con ficoeritrina con cianina 7 en tándem (PE-Cy7), CD117 conjugado con alofocianina (APC), CD81

conjugado con APC-Hilite 7 (APC-H7) de Becton Dickinson (San José, CA) y frente a antígenos intracelulares: IgKappa conjugado con APC y IgLambda conjugado con APCH7 de Becton Dickinson. Para el marcaje intracelular, empleamos el kit de fijación y permeabilización "Fix&Perm" siguiendo las indicaciones del fabricante (Nordic-Mubio, Susteren, Holanda).

3.4.1. Protocolo superficie

Brevemente, una vez disponemos de cada una de las condiciones en tubos de citometría, procedemos a realizar 2 lavados con 1mL de PBS + albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% a 1.800 rpm (5 min) para evitar uniones inespecíficas durante el marcaje de las Ig. Terminados los pasos de lavado añadimos los anticuerpos de membrana como indica en la *Tabla 3* e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente (T.A) y en oscuridad. Pasados los 15 min, lavamos con 2mL de PBS+BSA a 1.800 rpm (5 min), resuspendemos las muestras en 250 μ L de PBS y se adquiere por el CMF.

3.4.2. Protocolo intracelular

Tras la adición de los anticuerpos de superficie y su incubación. Pasados los 15 min se procede a lavar 2 veces con PBS a 1800 rpm (5 min). Añadimos 100 μ L de la solución fijadora A del reactivo Fix&Perm e incubamos durante 15 min a T.A y en oscuridad. Pasados los 15 minutos, lavamos con 1mL de PBS+BSA a 1800 rpm (5 min) y resuspendemos vigorosamente el botón celular. Una vez realizado este lavado, añadimos 100 μ L de la solución permeabilizante B del reactivo Fix&Perm para el marcaje de los anticuerpos intracelulares IgKappa y IgLambda (*Tabla 4*) e incubamos de nuevo la muestra durante 15 min a T.A. y en oscuridad. Finalmente, lavamos con 1mL de PBS+BSA a 1800 rpm (5 min), resuspendemos la muestra y la adquirimos en el citómetro de flujo.

Tabla 3: Panel de anticuerpos monoclonales de superficie.

Marcadores superficie							
Pacific Blue	HV500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81
5 μ L	5 μ L	3 μ l	10 μ l	10 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Tabla 4: Panel de anticuerpos monoclonales intracelular.

Marcadores superficie						Marcadores intracelulares	
Pacific Blue	HV500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	IgKappa c	IgLambda c
5 μ L	5 μ L	3 μ l	10 μ l	10 μ l	5 μ l	2.5 μ l	4 μ l

3.5. CULTIVO DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS TUMORALES DE LA LÍNEA RPMI8226 CON EL MICROGEL FUNCIONALIZADO

3.5.1. Descongelación de la línea RPMI8226 y condiciones de cultivo

Los viales de línea celular RPMI8226 criopreservados a -196°C en nitrógeno líquido contenían aproximadamente entre 4-8 millones de células conservadas en suero fetal bovino (FBS) + 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO). Dado que el DMSO es tóxico a T.A, el proceso de descongelación tiene que ser lo más rápido posible, para ello se calienta muy poco el vial en el baño a 37°C y se diluye rápidamente con 9mL de medio de cultivo RPMI1640. Posteriormente se centrifuga en un tubo Falcon de 10 mL a 1800 rpm a 5min. Nos deshacemos del sobrenadante y el pellet se resuspende con medio de cultivo RPMI1640 compuesto por 15%FBS, 1% L-glutamina (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Cat 25030081) y 1% Penicilina-Streptomicina (Gibco™- Fisher, Cat 15140122).

3.5.2. Cultivo de la línea celular RPMI8226 en suspensión y con microgel

Con el siguiente experimento se pretende evaluar, por un lado, las diferencias entre un cultivo sin soporte biomaterial y en microgel para esta línea celular, con el objetivo de demostrar con datos la importancia de los soporte 3D sobre modelos 2D. Dichos datos podrán ser extrapolados a qué condiciones recrean mejor, por tanto, el microambiente tumoral. Además, se espera que el microgel sea inocuo y no afecte a la viabilidad celular, demostrando así su biocompatibilidad con esta línea celular. Por otro lado, esperamos ver resultados diferenciados entre el microgel control y el resto de combinaciones de microgeles funcionalizados: microesferas con la última capa de colágeno, microesferas con la última capa de hialurónico y una combinación de ambas. Así pues, los resultados obtenidos podrían ser decisivos para hipotetizar sobre qué biomolécula está más involucrada en la interacción con las células de MM y por tanto, cual podría estar relacionada con la activación de rutas de resistencia a fármacos, así como si ambas tienen un efecto sinérgico o no. Para ello, el experimento se ha realizado durante 7 días, con toma de resultados a día 2, día 5 y día 7.

La esterilización del microgel se realiza con 3 lavados sucesivos con etanol al 70% para esterilizar el material, 6 lavados con PBS para asegurarnos de que no quede etanol residual, y para finalizar, 3 lavados con el propio medio con el que se van a cultivar las células. Todo ello se realiza con la ayuda de un tamiz estéril de $70\ \mu\text{m}$ y una pipeta Pasteur. Una vez estériles, cada tipo de microesferas se añadió a un tubo Falcon de 15mL vacío. A continuación, añadimos en cada pocillo $100\ \mu\text{L}$ de microgel + $200\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Posteriormente, realizamos el conteo de células con Tripán Blue (Sigma Aldrich Corporation, Cat T8154) considerando que por cada pocillo se cultivaran 150.000 células. Tras el conteo, resuspendemos un volumen que contenga el número de células requerido y se centrifuga. El pellet obtenido será resuspendido en un volumen que nos permita disponer en $200\ \mu\text{L}$ 150.000 células, quedando en los pocillos un volumen final de $500\ \mu\text{L}$ ($400\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo con 150.000 células + $100\ \mu\text{L}$ de microgel), en el caso del control sin soporte biomaterial se añadieron $500\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Finalmente, al tratarse de un en suspensión las placas de cultivo se dejan sembrando en un agitador orbital a 300 rpm.

Cabe destacar que, al tratarse de células en suspensión, los cambios de medio son delicados porque se pueden arrastrar células. El protocolo utilizado consistió en adicionar 400 μ L de medio a cada pocillo. Posteriormente, durante 15 min se mantiene en agitación para que se produzca la difusión de nutrientes del medio. Tras esto, se deja reposar una hora sin agitación, para que precipiten las células con el microgel y poder retirar los 400 μ L de medio adicionados anteriormente. Debido a que no se realiza un cambio total del medio, los cambios de medio se realizan de manera diaria.

3.5.3. Estudio de la proliferación mediante ensayo PicoGreen

El método elegido para medir la proliferación celular fue el ensayo PicoGreen. La proliferación se estima a partir de la cantidad de DNA presente en cada uno de los pocillos. Las 5 condiciones a estudio son: células en suspensión sin biomaterial, células en suspensión con microgel sin recubrir, células en suspensión con microgel funcionalizado con una última capa de colágeno, células en suspensión con microgel funcionalizado con última capa de HA, y células en suspensión con microgel funcionalizado con colágeno y HA en la última capa. Los tiempos estudiados fueron a día 2, 5 y 7 días.

En primer lugar, se preparan 100mL de tampón TBE (Tris Borato EDTA) a pH6.5 con 90ml agua UP, 0.653g de Na_2HPO_4 , 0.648g de NaH_2PO_4 , 1ml de EDTA. Después se enrasa con agua UP a 100mL y se filtra dejándolo en nevera a 4°C. En cada día de tiempo de recogida, se añade al TBE la papaína de latex de papaya (Sigma Aldrich Corporation, Cat P4762-50G) y L-cisteína (Sigma Aldrich Corporation, Cat C7477-25G), conformando un tampón de lisis óptimo. Para un volumen de 40mL de TBE, se añaden 63mg de L-cisteína y 9.68mg de papaína pura. Recalcularemos en base al TBE necesario para nuestro número de pocillos. Una vez preparado el tampón de digestión, se recogen las muestras en diferentes tubos eppendorf, centrifugando a 1800 rpm durante 5min y se retira el sobrenadante cuidadosamente. A continuación, se realiza un lavado con 1 mL de PBS a 1800 rpm durante 5 min. Finalmente, se añaden 500 μ l de buffer de digestión incubándose las muestras durante 18h, a 60°C.

La preparación del PicoGreen se realizó empleando el kit Quant-iT Picogreen dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific, Cat P7589), teniendo que diluir el PicoGreen a una dilución 1:200 sobre una solución TE 1X (Tris EDTA), la cual se prepara con anterioridad a partir de una solución TE 20X. En todo momento debido a la fotosensibilidad del reactivo PicoGreen, se trabajó en condiciones de oscuridad. La recta patrón se realizó a partir de una solución de DNA del fago lambda a una concentración conocida.

Terminada la incubación de las muestras tras las 18h, se procedió a vortexearlas y centrifugarlas a 1800 rpm durante 1 min. A continuación, debido a la alta sensibilidad de la técnica, en una placa de 96 pocillos, opaca, añadimos con una pipeta multicanal 25 μ L de agua UP en los pocillos donde irán nuestras muestras para evitar que se salgan de la recta patrón. Posteriormente, añadimos 5 μ L de cada muestra. En el caso de la curva patrón, se añaden 30 μ L a cada pocillo. Se incluyen pocillos con microesferas de alginato como blanco control del microgel. Por último, nuevamente con la pipeta multicanal, añadimos 170 μ L a cada pocillo del mix de PicoGreen y homogeneizamos todas las muestras manualmente. Tras 5 min de incubación a T.A y en oscuridad, leemos la placa en el espectrofotómetro con filtro 485/535.

3.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se han realizado mínimo tres replicas biológicas en todos los experimentos, y se presentan datos de desviación (SD, del inglés *Standard Deviation*) en todos ellos. Todos los datos adjuntados han sido evaluados estadísticamente y se consideran robustos. Consideramos determinante para extraer conclusiones en el ensayo PicoGreen, la realización de un estudio estadístico detallado. En este, se analizaron 4 réplicas biológicas junto con 4 réplicas técnicas. Con la ayuda del software GraphPad, se realiza un estudio ANOVA de dos factores, con un nivel de significación ($\alpha=0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE FLUIDOS

La elección de alginato como biopolímero para la formación de micropartículas, se debe a su capacidad de gelificación inmediata, a su alta biocompatibilidad y a que no se espera que degrade significativamente en las condiciones de cultivo.

En relación al fluido inmiscible como fase continua, la primera opción fue el aceite de oliva virgen extra. Sin embargo, fue descartada porque se producían aglomerados de microesferas. Aunque este primer problema podría solucionarse con un emulsificante como la lecitina de soja, se consideró muy laboriosa la eliminación de aceite posterior a la gelificación de las microesferas. El sistema de microfluídica era ineficaz con dicho fluido para producir microesferas de alginato cálcico. Por ello, se optó por un disolvente orgánico, debido a su volatilidad y propiedades tensoactivas óptimas. Concretamente se seleccionó uno con un alto peso molecular y baja toxicidad, el cloroformo. Su viscosidad es inferior a la del alginato, aunque dicha diferencia podía ser compensada por un flujo elevado del cloroformo actuando como la fase continúa.

En resumen, el cloroformo es un fluido óptimo para nuestro objetivo, que no requería una modificación con un surfactante y que en conjunto con el alginato de sodio, tenía un amplio rango de flujos permitidos en el sistema de microfluídica diseñado.

4.2. ESTUDIO DE TAMAÑO DE PARTICULA Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS

Tabla 5: Tamaño promedio de partícula obtenido en cada condición junto con desviación estándar.

	Fase dispersa (Clf) (ml/min)	Fase continua (Alg) (ml/min)	Tamaño promedio \pm SD (μ m)
Condición 1	0.3	0.03	273.4 \pm 16.8
Condición 2	1.3	0.03	268.4 \pm 14.9
Condición 3	3	0.03	263.2 \pm 16.5
Condición 4	0.3	0.13	401.0 \pm 18.2
Condición 5	1.3	0.13	333.8 \pm 14.5
Condición 6	3	0.13	276.6 \pm 12.7
Condición 7	0.3	0.3	473.6 \pm 50.2
Condición 8	1.3	0.3	386.2 \pm 15.6
Condición 9	3	0.3	350.5 \pm 19.1

Los resultados obtenidos tras las medidas de diámetro de cada una de las microesferas, nos permiten afirmar que la dimensión de partícula es dependiente de los flujos de cloroformo y de alginato. De acuerdo con la literatura, la relación entre los flujos de las dos fases es uno de los parámetros más relevantes en el proceso de formación de la gota, aunque hay otros parámetros del proceso que son influyentes, como es la relación entre las viscosidades de los dos fluidos, o la concentración de la disolución de alginato que no se han tenido en cuenta en

este trabajo porque su modificación podría suponer alterar la composición de las microesferas obtenidas o sus características superficiales. En nuestro proceso hay otros parámetros que entran en juego, como la agitación del medio durante la gelificación de las microesferas y el tiempo de gelificación, pero se consideraron menos influyentes sobre el tamaño de partícula aunque son importantes para evitar su aglomeración y asegurar la completa gelificación del alginato. Estos parámetros se fijaron en exceso.

El tamaño de microesferas aumenta al aumentar el flujo de fase dispersa y disminuye con el flujo de fase continua, como se ve en la *Figura 6*.

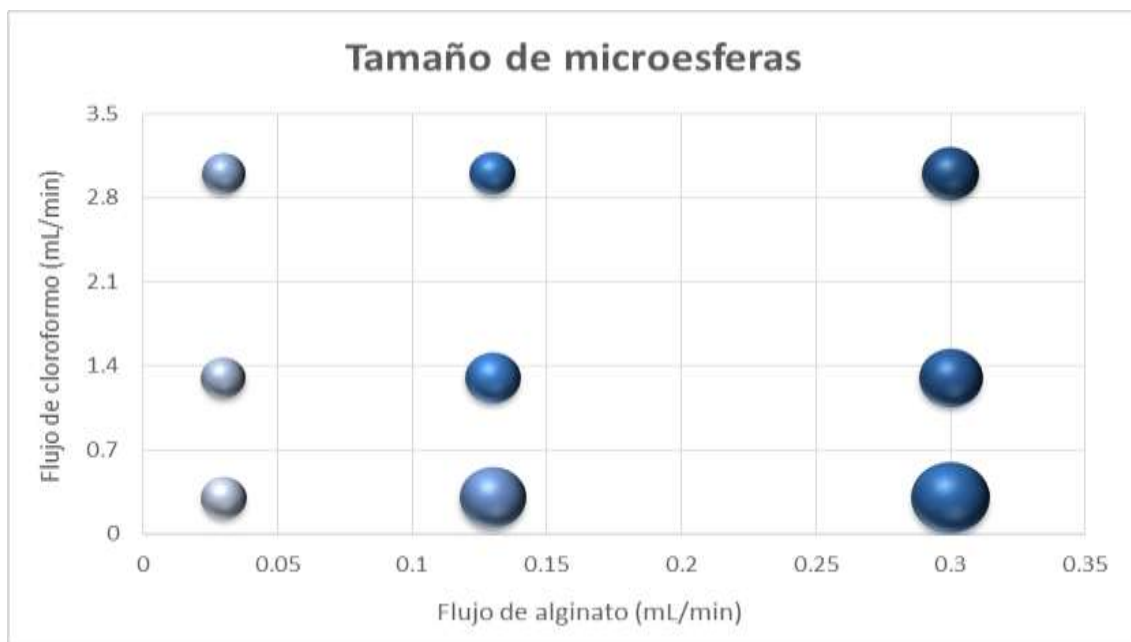


Figura 6: Representación gráfica de la influencia de los flujos de medio disperso y continuo sobre el tamaño de microesferas. El diámetro de las esferas representadas es proporcional a los tamaños de microesferas obtenidas en cada condición.

La eficacia de un sistema de microfluídica radica en la estabilidad termodinámica de la separación de fases entre ambos fluidos. La adquisición de un equilibrio de tensiones entre ambas fases ha sido demostrada en la totalidad de las condiciones, a excepción de la condición 7. Para demostrar la monodispersión de las partículas obtenidas en nuestro sistema, las condiciones han sido representadas en histograma de tamaños (consúltese *Anexo I*). Todas las condiciones siguen una distribución gaussiana, o normal, a excepción de la ya mencionada condición 7. En esta condición 7, la población de microesferas fue heterogénea, con una SD de $50\mu\text{m}$, valor considerablemente superior al resto de condiciones. Además, dicha inestabilidad termodinámica se puede apreciar en el histograma de tamaños de dicha condición (*Figura AI* de *anexo I*). El motivo se debe a que en la condición 7, la diferencia de densidades se hace visible pues los flujos son equivalentes. Se obtienen microesferas irregulares con una deformación en la parte final.

Las microesferas de menor tamaño obtenidas fueron todas las condiciones para las cuales el flujo de alginato era 0,03mL/min, así como la condición 6, con un flujo de alginato 0,13mL/min y el máximo caudal planteado de cloroformo, 3mL/min. Los tamaños logrados fueron, 273,42, 268,42, 263,26 y 276,64 μm , para las condiciones 1,2,3 y 6.

4.3. RENDIMIENTO DE CONDICIONES ESTUDIADAS

Los resultados obtenidos afirman que un mayor rendimiento viene ligado a un mayor flujo de alginato. El peso medio obtenido para las condiciones 1, 2 y 3 es de 3mg aproximadamente para el tiempo de operación de 4 min. El aumento del flujo a 0.13mL/min tiene como consecuencia la obtención de un rendimiento 10 veces mayor, con valores promedio en seco de 35mg. Así mismo, con el mayor flujo de alginato se obtuvo el mayor rendimiento.

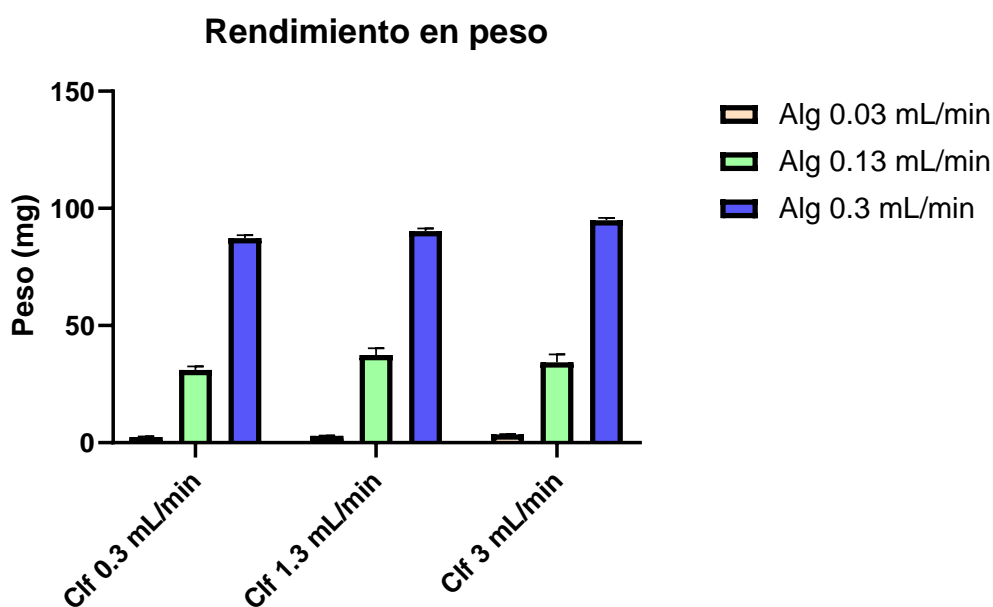


Figura 7: Representación del rendimiento en peso (mg) para cada condición, para un tiempo de operación de 4 minutos.

4.4. INFLUENCIA DEL FLUJO DE CLOROFORMO EN EL TAMAÑO: ELECCIÓN DE CONDICIÓN ÓPTIMA

Los resultados obtenidos demuestran, de nuevo, una disminución de tamaño conforme el flujo de cloroformo aumenta. Además, observamos que las poblaciones obtenidas continúan siendo homogéneas e uniformes. La monodispersión puede ser consultada en la figura A1

(Anexo I). Las partículas con menores dimensiones obtenidas fueron de $177.33 \pm 23.38 \mu\text{m}$. Dicha condición se corresponde al mayor flujo de cloroformo.

Tabla 6: Tamaño promedio de microesfera para cada condición, junto con SD

	Tamaño promedio \pm SD (μm)
Condición A	401.02 \pm 18.22
Condición B	333.82 \pm 14.57
Condición C	276.64 \pm 12.70
Condición D	191.10 \pm 26.48
Condición E	177.33 \pm 23.38

En la *Figura 8* se puede apreciar una disminución progresiva de tamaño de microesferas con el aumento de flujo de cloroformo. Además podemos concluir que dicha variación negativa deja de ser lineal cuando el flujo asciende a 5ml/min.

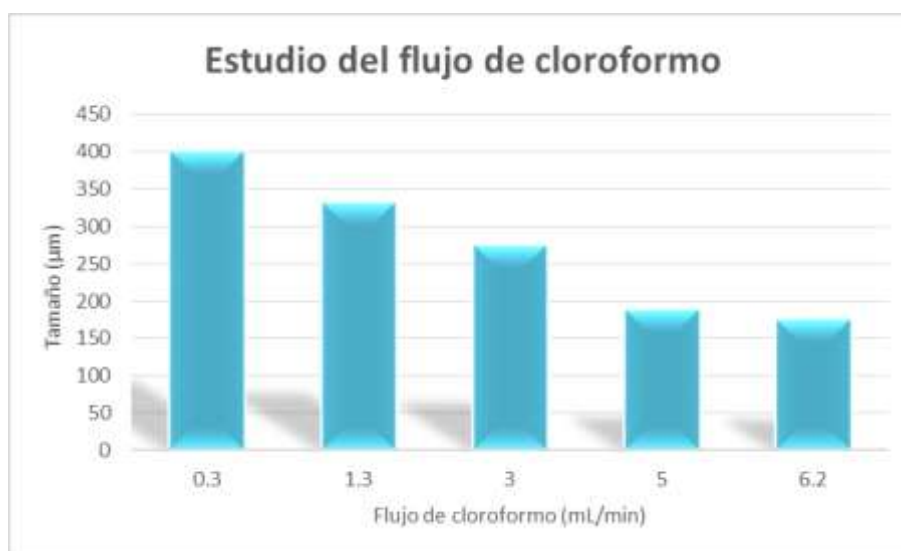


Figura 8: Representación de tamaño promedio de cada condición (de A a E, de izda a dcha)

Como conclusión, y de acuerdo a una producción de microesferas cuyo compromiso cumpla rendimiento y tamaño mínimo, se establece la condición E (descrita en la *Tabla 7*) como la elegida para producir las microesferas que conformarán el microgel. Por último, tras un análisis de tamaños, podemos concluir que es una población monodispersa, con una distribución gaussiana (*Figura 9*).

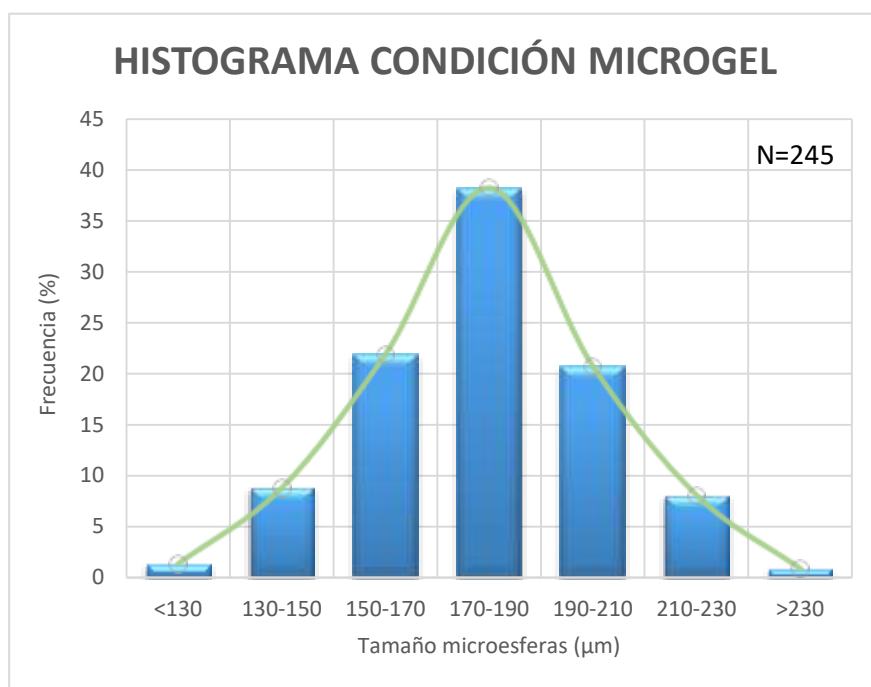


Figura 9: Histograma de tamaños de microesferas con un flujo de medio disperso 0.13mL/min, y un flujo de medio continuo 6.2mL/min. Se puede observar la homogeneidad de dicha población muestral (N=245).

4.5. MICROESFERAS DE ALGINATO: TOPOLOGÍA Y MORFOLOGÍA

Las imágenes de FESEM nos permiten apreciar la superficie rugosa y homogénea de las microesferas así como su esfericidad. Por otra parte, la porosidad del biomaterial esperada se confirma con imágenes de mayores aumentos. El tamaño de poro es nanométrico y profundo, y con un microscopio de haz de iones focalizados (FIB, del inglés *Focused Ion Beam*), se podría extrapolar dicha estructura porosa a la totalidad de las microesferas.

Las dimensiones observadas de las microesferas son ligeramente inferiores a las esperadas (véase *Figura 10*). Esta reducción de tamaño, de unas 10 μm , se debe al proceso de secado ya mencionado.

Por tanto, la porosidad así como que el alginato es un biomaterial hidrofílico favorece la aplicabilidad de dichas microesferas. La gran capacidad de absorción de agua de los geles de alginato facilitan que su densidad se aproxime a la de los medios de cultivo líquido, de esta forma en el microgel la suspensión de microesferas se mantiene con facilidad sin que las partículas se posen en el fondo o floten en la superficie. Los poros aumentan la superficie de contacto con las biomoléculas (Col y HA) con las que se desean funcionalizar estas microesferas.

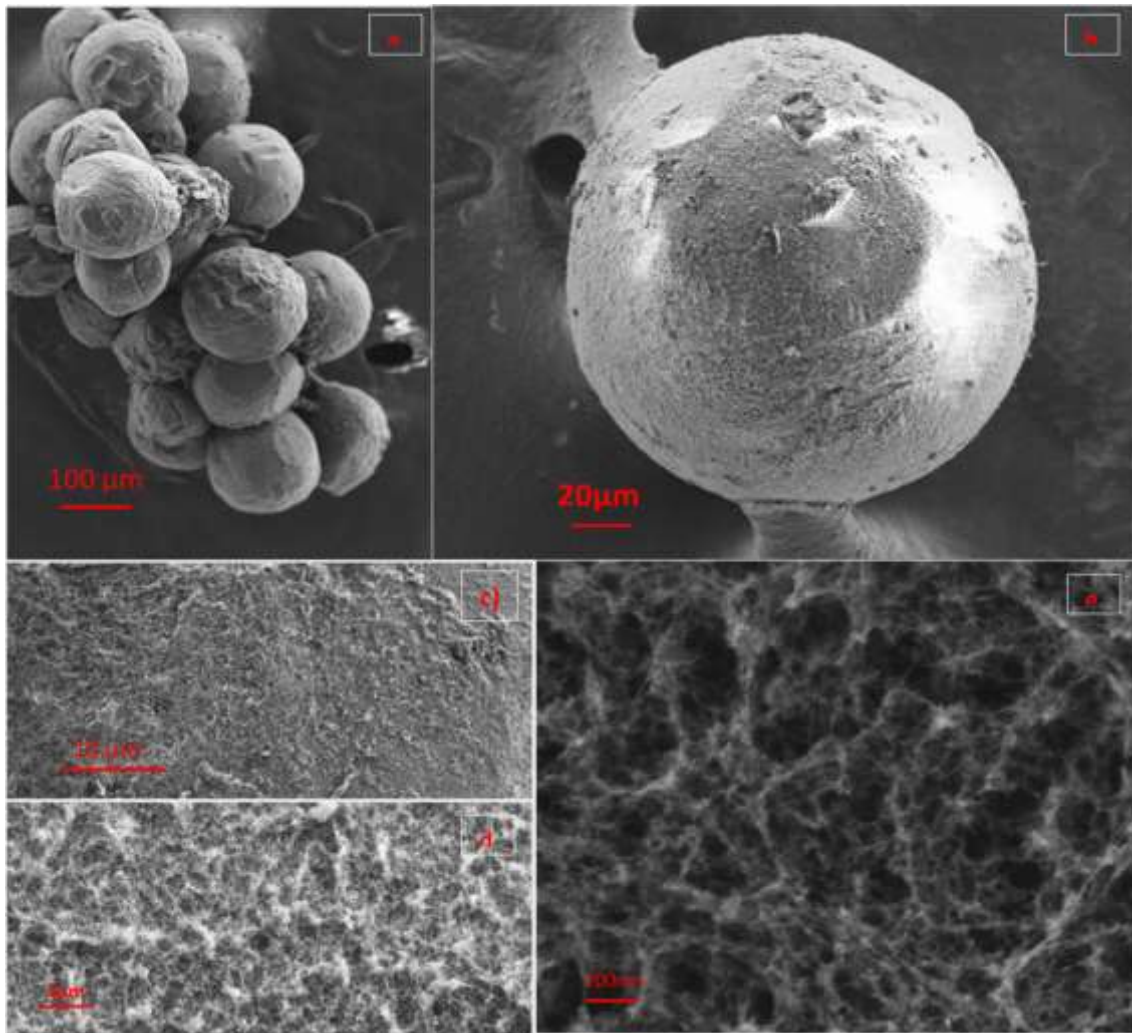


Figura 10: Imágenes de las microesferas de alginato cálcico tomadas en FESEM. En la imagen b) se aprecia la superficie homogénea y rugosa de una microesfera escogida al azar. Por último, las imágenes c), d), y e) muestran la porosidad y rugosidad del biomaterial.

4.6. CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DEL COLÁGENO EN EL RECUBRIMIENTO

En la primera capa, de Col I, se han obtenidos valores promedios de 1.06 μg Col I por mg microesfera. En las sucesivas funcionalizaciones de Col I, dicho valor aumenta, hecho que nos permite confirmar que el Col I recubre las microesferas. Además, con esta técnica se puede estimar la cantidad de colágeno aproximada por mg microesferas funcionalizadas. Además, la confirmación de la estabilidad de los recubrimientos de LbL se establece al observar los valores de proteína para las muestras de microesferas funcionalizadas con HA. Dichas microesferas cuya última capa es HA, presentan valores de Col I similares a las microesferas previas, sin la adición de esa última capa. La leve disminución de Col I después de cada capa de HA podría deberse al efecto del lavado realizado entre capas.

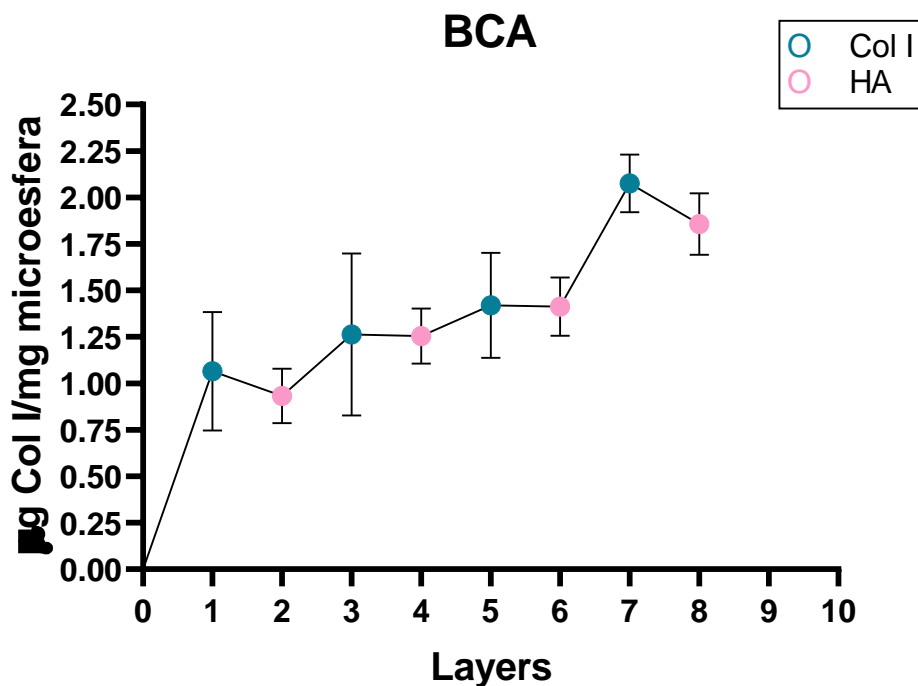


Figura 11: Representación gráfica de la cuantificación de μg Col I/mg de microesfera.

4.7. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FTIR

En primer lugar, los espectros de cada FTIR realizado han sido compilados. Además se ha optado un desplazamiento de los mismos en el eje Y para una comparativa más visual (*Figura 12*). El espectro de alginato de calcio nos sirve como control. Se observan las bandas características del alginato sódico en el intervalo de 980 a 1200 cm^{-1} propias de la vibración tensional de C-O del grupo piranosil. Además también tenemos una banda a 1400 cm^{-1} propia de sal iónica carboxilada. En cuanto al espectro de Col I, destacan los picos amida III correspondientes a tensiones de C-OH (1300 - 1180 cm^{-1}) y una banda pronunciada de amida I (1609 cm^{-1}), debido a tensiones C=O asociadas a vibraciones N-H. Por última, la presencia de HA se hace notar en bandas a 814 y $665\text{ (cm}^{-1})$ debido a tensiones C-O-C. Además dos picos característicos a 2867 y 2929 reflejan tensiones C-H. Las microesferas de las condiciones HA y Col I, presentan colágeno y HA, por lo que simplemente encontrar picos característicos de ambas biomoléculas confirma la funcionalización. Se adjuntan imágenes del espectro ampliado en el Anexo II.

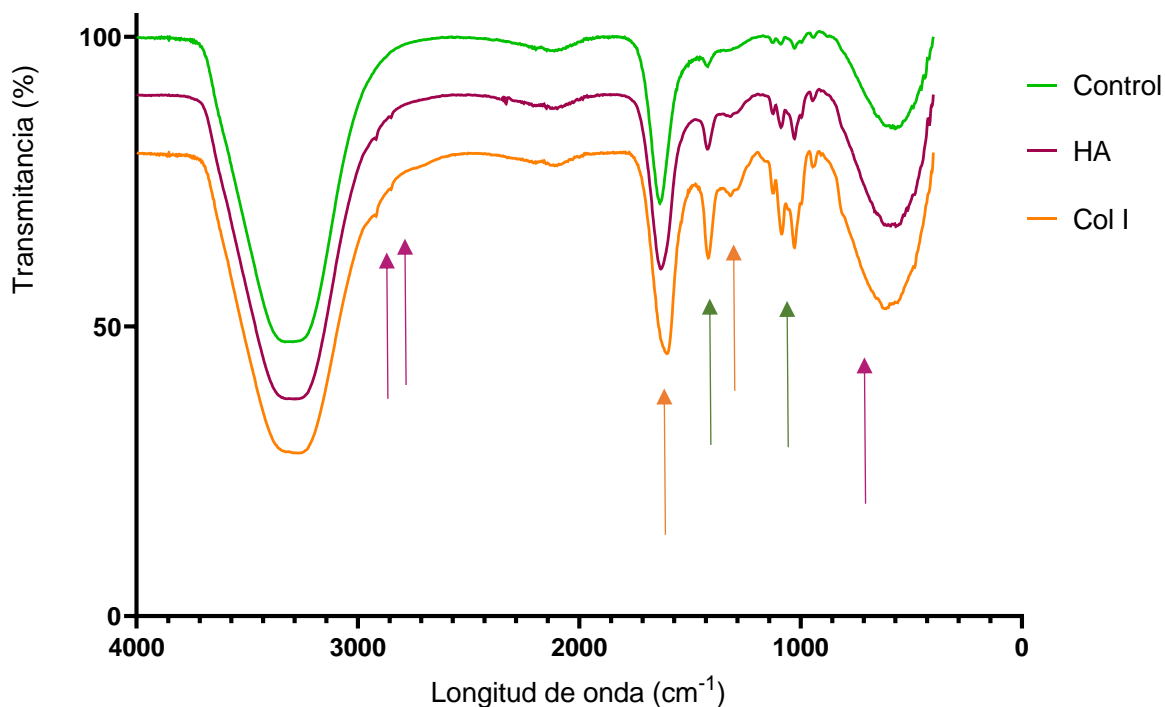


Figura 12: Visualización de espectros FTIR de control de microesferas (Control), de microesferas acabadas en capa de HA (HA) y acabadas en capa de Col I (Col I). Las flechas indican las bandas características a destacar.

4.8. INMUNOFENOTIPO DE LA LÍNEA CELULAR RPMI 8226

El inmunofenotipo de la línea celular RPMI 8226 se evaluó mediante citometría de flujo empleando distintos anticuerpos monoclonales, pudiéndose observar el siguiente patrón inmunofenotípico (*Figura 13*): CD38⁺, CD56^{+/-}, CD27⁻, CD117⁻, CD19⁻, CD81⁺, CD138⁺, CD45⁻, IgKappa⁻, IgLambda⁺. Comparando este patrón con las bases de datos del ATCC, podemos corroborar que la línea celular empleada corresponde con células RPMI 8226.

Entre todos los marcadores utilizados destaca que el componente monoclonal de la línea celular es Lambda así como la expresión positiva de CD38 y CD138 y la ausencia de CD19.

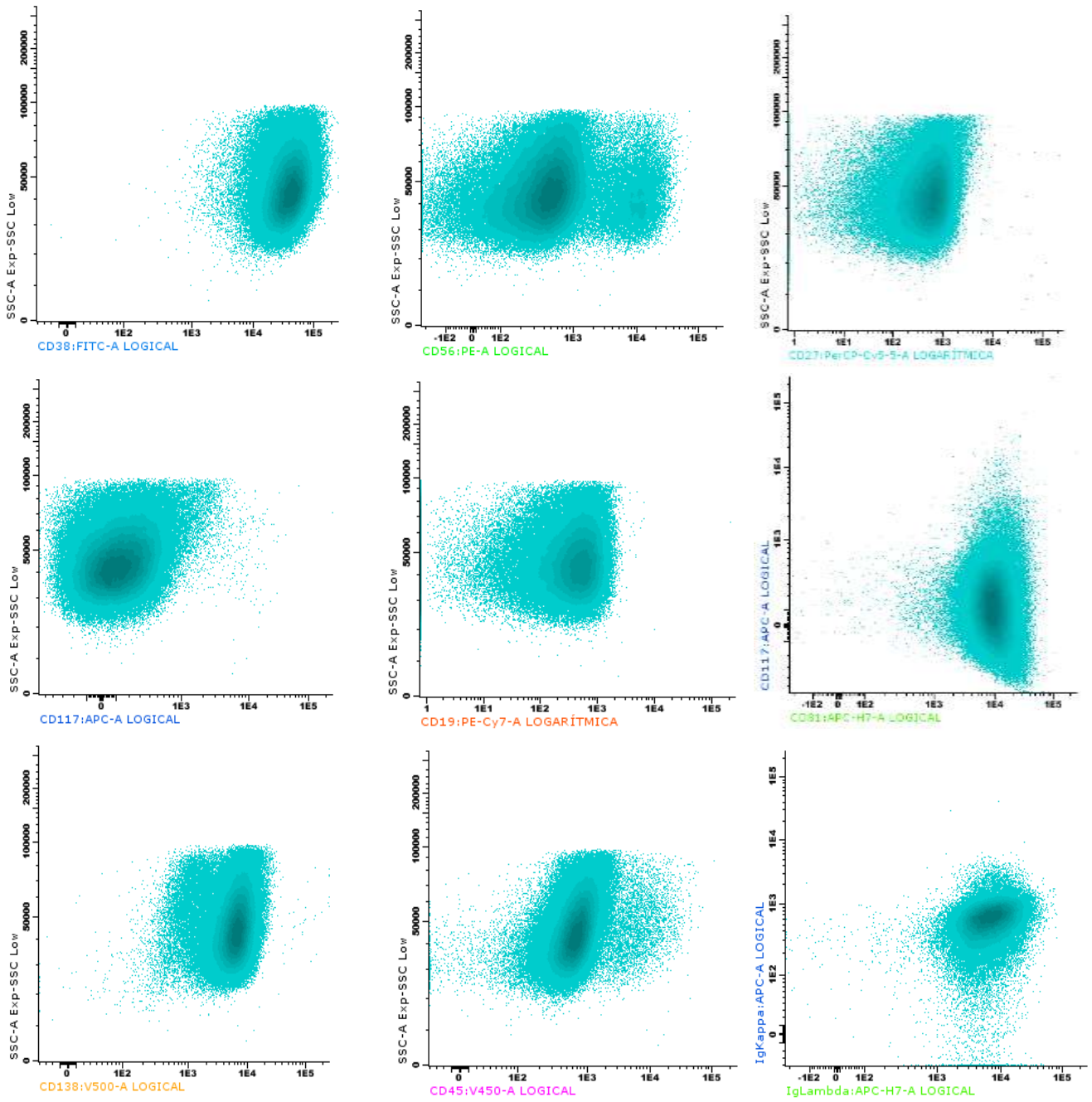


Figura 13: Diagrama de puntos para verificar el patrón inmunofenotípico de las CPs.

4.9. ENSAYO PICOGREEN

Se han registrado valores de proliferación para cada una de las condiciones estudiadas. El cultivo a día 0 parte de 15000 células por pocillo. En el día 2 observamos que en todos los casos, el cultivo prolifera. Sin embargo, ya se observan diferencias en el cultivo en suspensión sin soporte biomaterial con el resto de cultivos tridimensionales. Con esto, corroboramos la alta inocuidad del alginato. El cultivo microgel control junto con Col I presentan 300000 células aproximadamente. Destacan positivamente los cultivos con microgel de HA y el mix de HA y Col (350000 células).

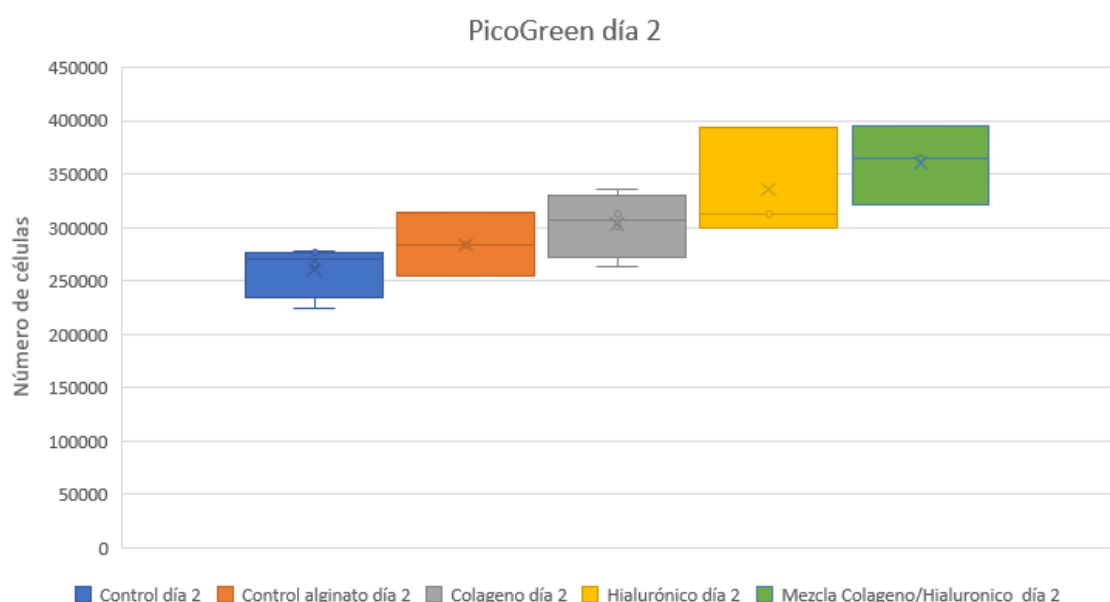


Figura 14: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 2. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).

En el cultivo recogido a día 5, observamos un aumento en todas las casos propuestos con respecto al día 2, reflejándose unas buenas condiciones de cultivo para todos ellos, y por tanto, sin contaminación ni influencia negativa de ninguna de las biomoléculas sobre nuestras células. Así mismo, se vuelve a observar una mayor proliferación del microgel control y del microgel colágeno sobre el cultivo en suspensión. De nuevo, vemos que el microgel HA y el mix de HA y Col alcanzan valores de proliferación altísimos, con una diferencia de células con respecto a Col y control de microgel de 430000 células más por pocillo. Dicho incremento, dada la igualdad del resto de variables del cultivo, debe estar relacionado con el HA.

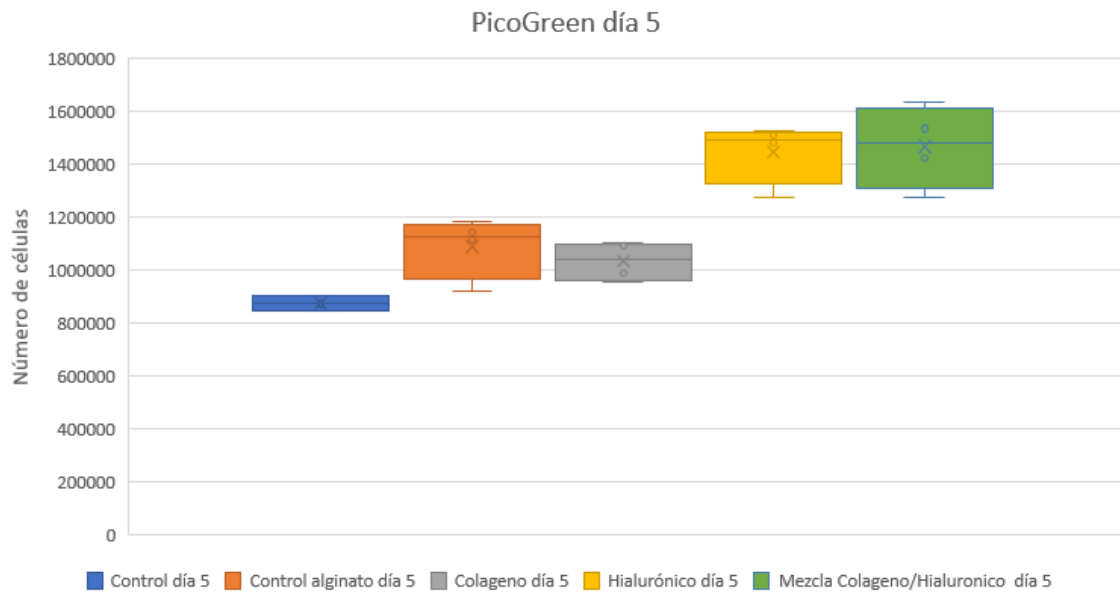


Figura 15: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 5. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).

En el día 7, observamos confluencia en los resultados obtenidos. En todos los casos, el cultivo alcanza un máximo de 2 millones de células, inferior al esperado. Esto es debido a la elevada proliferación en los días previos, que ha disminuido los nutrientes del medio, ocasionando un efecto perjudicial en la viabilidad. Si bien es cierto, podemos obtener conclusiones como que siguen habiendo diferencias significativas entre el cultivo en suspensión con respecto al microgel.

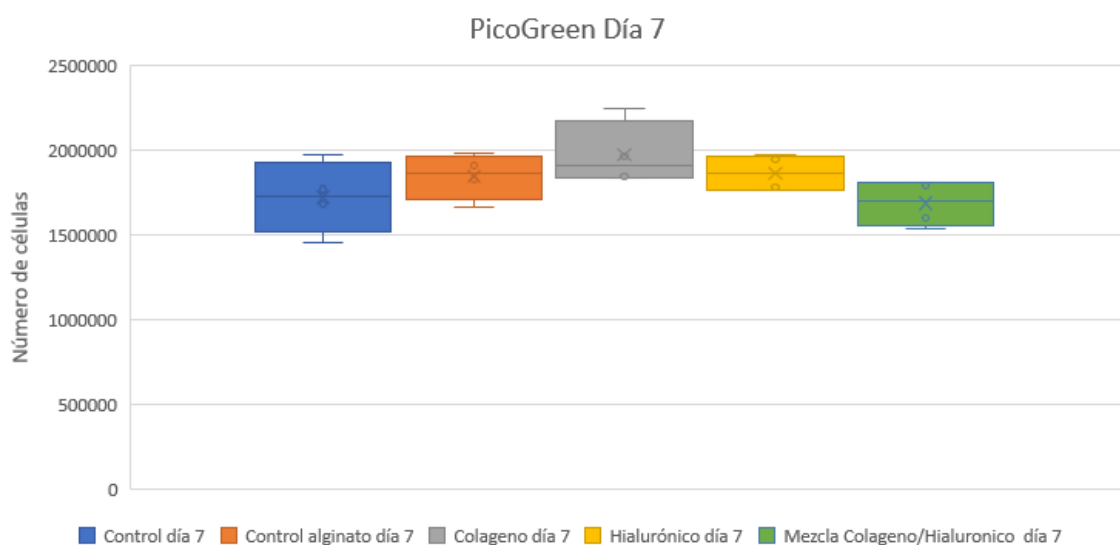


Figura 16: Representación del número de células promedio obtenidos en cada condición evaluada a día 7. Se presentan barras de error para la SD (desviación estándar).

Los resultados obtenidos nos confirman la necesidad de cultivar células plasmáticas en un soporte biomaterial tridimensional, siendo el microgel de alginato una opción excelente. Se puede confirmar que el HA produce un aumento de la proliferación significativo en esta línea celular. En base a nuestros resultados, el microgel funcionalizado con HA es la mejor opción, a priori, para cultivar la línea. El colágeno no ha mostrado una diferencia significativamente mayor con respecto al microgel de alginato, aunque tampoco su presencia ha supuesto una influencia negativa. Además, el mix con la mitad de población de microesferas de colágeno y la otra mitad de HA prolifera de igual manera que el microgel de únicamente HA, con el doble de biomolécula presente. Por tanto, no se descarta la implicación del colágeno en la proliferación de esta línea celular. Así mismo, en este estudio no se ha logrado determinar la sinergia entre Col y HA

Los resultados se tendrán que confirmar en futuros trabajos con un estudio del ciclo celular, y la caracterización del inmunofenotipo de células plasmáticas del cultivo. Se planteará la realización de estudios de rutas de activación de resistencia a fármacos para analizar la implicación de esta biomolécula, así como la adhesión con células de BM

4.10. ANÁLISIS ANOVA DE DOS FACTORES

El análisis ANOVA, por un lado, establece el factor tiempo como un efecto significativo ($p < 0.0001$) sobre las condiciones de cultivo. Además, también se considera el factor condición de cultivo significativo sobre los resultados obtenidos ($p < 0.0001$). Dicho esto, la comparación múltiple entre todas las condiciones estudias permite establecer que:

- A día 2 las condiciones no son significativamente distintas.
- A día 5, todas las condiciones son significativamente diferentes, a excepción de microgel control con microgel Col que son considerados iguales estadísticamente, al igual que el microgel HA con respecto a microgel HA+Col.
- A día 7 no se consideran diferentes: control vs microgel Col+HA, control vs microgel HA, y microgel Col vs microgel HA. $p < 0.0001$

Los resultados descritos quedan adjuntados en el Anexo III.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del estudio pueden resumirse brevemente en las siguientes:

- El sistema de microfluídica *flow-focusing* diseñado funciona de manera óptima con la solución de alginato como fase dispersa y el cloroformo como fase continua a pesar de la diferencia de densidades.
- El dispositivo diseñado permite la producción de microesferas de manera autónoma, reproducible y sencilla. Además, destaca la consecución de una alta monodispersidad en las microesferas de alginato.
- El sistema de microfluídica con las dimensiones de canales utilizadas permite obtener microesferas uniformes y esféricas en un rango muy amplio: de 160 a 450 μm . Además, tras el análisis de ambos flujos, podemos afirmar que se alcanza un control sobre dicho sistema. Por ello, se podrá trasladar este dispositivo a multitud de aplicaciones biomédicas e industriales que requieran distintos tamaños de microesferas.
- Se corrobora la eficacia del protocolo Layer-by-Layer para la funcionalización de las microesferas.
- El sistema 3D basado en microgel conformado por microesferas de diámetro medio de 177 μm favorece la proliferación de las CPs de línea celular RPMI 8226. De entre las biomoléculas analizadas, el HA se ha visto que tiene un mayor efecto de proliferación con respecto al resto de sistemas 3D.

BIBLIOGRAFÍA

ABE M, HIURA K, WILDE J, SHIOYASONO A, MORIYAMA K, HASHIMOTO T, KIDO S, OSHIMA T, SHIBATA H, OZAKI S, INOUE D, MATSUMOTO T. (2004). Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood*, 104(8):2484-91.

AMOS B, AGARWAL A, KANEKAR S. (2016) Imaging of multiple myeloma. *Hematology Oncology Clinics of North America*, 30:843-865.

BERGSAGEL PL, KUEHL WM, ZHAN F, SAWYER J, BARLOGIE B, SHAUGHNESSY J JR. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106:296-303.

BROYL A, HOSE D, LOKHORST H, DE KNEGT Y, PEETERS J, JAUCH A, BERTSCH U, BUIJS A, STEVENS-KROEF M, BEVERLOO HB, VELLENGA E, ZWEEGMAN S, KERSTEN MJ, VAN DER HOLT B, EL JARARI L, MULLIGAN G, GOLDSCHMIDT H, VAN DUIN M, SONNEVELD P. (2010). Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*, 116(14):2543-53.

CAI, K, ZHANG, J, DENG LH, YANG L, HU Y, CHEN C, XUE L, WANG L. (2007). Physical and Biological Properties of a Novel Hydrogel Composite Based on Oxidized Alginate, Gelatin and Tricalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering. *Advanced Engineering Materials*, 9 (12), 1082–1088.

CANCER STAT FACTS: MYELOMA, 2018. Consultado el 3 de Julio de 2019

CHATTOPADHYAY S, RAINES RT. (2014) Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8):821-33.

CHIECCHIO L, DAGRADA GP, IBRAHIM AH, DACHS CABANAS E, PROTHEROE RK, STOCKLEY DM, ORCHARD KH, CROSS NC, HARRISON CJ, ROSS FM; UK MYELOMA FORUM. (2009). Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, 94(12):1708-13.

CHNG WJ, HUANG GF, CHUNG TH, NG SB, GONZALEZ-PAZ N, TROSKA-PRICE T, MULLIGAN G, CHESI M, BERGSAGEL PL, FONSECA R. (2011). Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*, 25(6):1026-35.

CHNG WJ, KUMAR S, VANWIER S, AHMANN G, PRICE-TROSKA T, HENDERSON K, CHUNG TH, KIM S, MULLIGAN G, BRYANT B, CARPTEN J, GERTZ M, RAJKUMAR SV, LACY M, DISPENZIERI A, KYLE R, GREIPP P, BERGSAGEL PL, FONSECA R. (2007) Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Research*, 67(7):2982-9.

COLLINS CD. (2010). Multiple myeloma. *Cancer Imaging*, 10:20-31.

CONCHOUSO D, RAWASHDEH E, CASTRO D, AREVALO A, FOULDS G. (2013). Optimized Channel Geometry of a Flow-Focusing Droplet Generator for Parallelization. *COMSOL conference*

DIMOPOULOS K, GIMSING P, GRONBAEK K. (2014). The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 4:e207.

GERECKE C, FUHRMANN S, STRIFLER S, SCHMIDT-HIEBER M, EINSELE H, KNOP S. (2016). The diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Dtsch Arztebl Int.*, 113:470-476.

GÓMEZ RAPOSO C, DE CASTRO CARPEÑO J, GONZÁLEZ BARÓN M. (2007). Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures and genetic predisposition. *Med Clin (Barc)*, 128(10):390-6.

HAIYONG AO, CHUCHENG LIN, BINEN NIE, SHENGBING YANG, YOUTAO XIE, YIZAO WAN AND XUEBIN ZHENG (2017). The synergistic effect of type I collagen and hyaluronic acid on the biological properties of Col/HA-multilayer-modified titanium coatings: an in vitro and in vivo study. *RSC Advances*, 7(42), 25828–25837.

HAZLEHURST LA, DAMIANO JS, BUYUKSAL I, PLEDGER WJ, DALTON WS. (2000). Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) *Oncogene*, (38):4319-27.

KAKLAMANI G, CHENELER D, GROVER LM, ADAMS MJ, BOWEN J. (2014). Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 36:135-42.

KAWANO Y, MOSCHETTA M, MANIER S, GLAVEY S, GÖRGÜN GT, ROCCARO AM, ANDERSON KC, GHOBRIAL IM. (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunology Reviews*, 263(1):160-72.

KEATS JJ, CHESI M, EGAN JB, GARBITT VM, PALMER SE, BRAGGIO E, VAN WIER S, BLACKBURN PR, BAKER AS, DISPENZIERI A, KUMAR S, RAJKUMAR SV, CARPTEN JD, BARRETT M, FONSECA R, STEWART AK, BERGSAGEL PL. (2012) Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120(5):1067-76.

KIBLER C, SCHERMUTZKI F, WALLER HD, TIMPL R, MÜLLER CA, KLEIN G. (1998). Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules. *Cell Adhes Commun.*, 5(4):307-23.

LANDGREN O, KYLE RA, PFEIFFER RM, KATZMANN JA, CAPORASO NE, HAYES RB, DISPENZIERI A, KUMAR S, CLARK RJ, BARIS D, HOOVER R, RAJKUMAR SV. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22):5412-7.

MAGRANGEAS F, AVET-LOISEAU H, GOURAUD W, LODÉ L, DECAUX O, GODMER P, GARDERET L, VOILLAT L, FACON T, STOPPA AM, MARIT G, HULIN C, CASASSUS P, TIAB M, VOOG E, RANDRIAMALALA E, ANDERSON KC, MOREAU P, MUNSHI NC, MINVIELLE S. (2013). Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*, 27(2):473-81.

MATHEWS S, BHONDE R, GUPTA P, K TOTEY (2011). A novel tripolymer coating demonstrating the synergistic effect of chitosan, collagen type 1 and hyaluronic acid on osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(1), 270–276.

MORRISON SJ, SCADDEN DT. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483):327-34.

NAYMAGON L, ABDUL-HAY M. (2016). Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *Journal Hematology and Oncology*, 9:52-016-0282-1.

- RAMACHANDRAN IR, MARTNER A, PISKLAKOVA A, CONDAMINE T, CHASE T, VOGL T, ROTH J, GABRILOVICH D, NEFEDOVA Y. (2013). Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol.*, 190(7):3815-23.
- REAGAN MR, LIAW L, ROSEN CJ, GHOBRIAL IM. (2015). Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: emerging roles of the osteoblast. *Bone*, 75:161-169.
- REAKASAME S, BOCCACCINI AR. (2018) Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 19(1):3-21.
- SEIFFERT, S. (2012). Microgel Capsules Tailored by Droplet-Based Microfluidics. *ChemPhysChem*, 14(2), 295–304.
- SERBAN MA, SCOTT A, PRESTWICH GD. (2008) Use of hyaluronan-derived hydrogels for three-dimensional cell culture and tumor xenografts. *Current Protocols in Cell Biology, Chapter 10: Unit 10.14*.
- TANCREED TM, BELCH AR, REIMAN T, PILARSKI, LM, KIRSHNER J. (2008). Altered Expression of Fibronectin and Collagens I and IV in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(3), 239–247.
- TØNNESEN, H. H., & KARLSEN, J. (2002). Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621–630.
- UTECH S, PRODANOVIC R, MAO AS, OSTAFE R, MOONEY DJ, WEITZ DA. (2013). Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture. *Advanced Healthcare Materials*, 4(11):1628-33.
- VACCA A, RIA R, PRESTA M, RIBATTI D, IURLARO M, MERCHIONNE F, TANGHETTI E, DAMMACCO F. (2001). $\alpha(v)\beta(3)$ integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Experimental Hematology*, (8):993-1003.
- VINCENT T, MECHTI N. (2005). Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. *Leukemia and Lymphoma*, 46(6):803-11.
- VINCENT T, MOLINA L, ESPERT L, MECHTI N. (2003). Hyaluronan, a major non-protein glycosaminoglycan component of the extracellular matrix in human bone marrow, mediates dexamethasone resistance in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 121(2), 259–269.
- ZHAO MY, LI LH, LI B, ZHOU CR. (2014) LBL coating of type I collagen and hyaluronic acid on aminolyzed PLLA to enhance the cell-material interaction. *eXPRESS Polymer Letters Vol.8, No.5* 322–335
- ZHOU W, STUKEL JM, CEBULL HL, WILLITS RK. (2016). Tuning the Mechanical Properties of Poly(Ethylene Glycol) Microgel-Based Scaffolds to Increase 3D Schwann Cell Proliferation. *Macromolecular Bioscience*, 16(4):535-44

ANEXO I. HISTOGRAMAS DE LAS CONDICIONES A ESTUDIO

A continuación, se presentan los histogramas que justifican las conclusiones extraídas de cada una de las condiciones propuestas en el apartado 5.2.

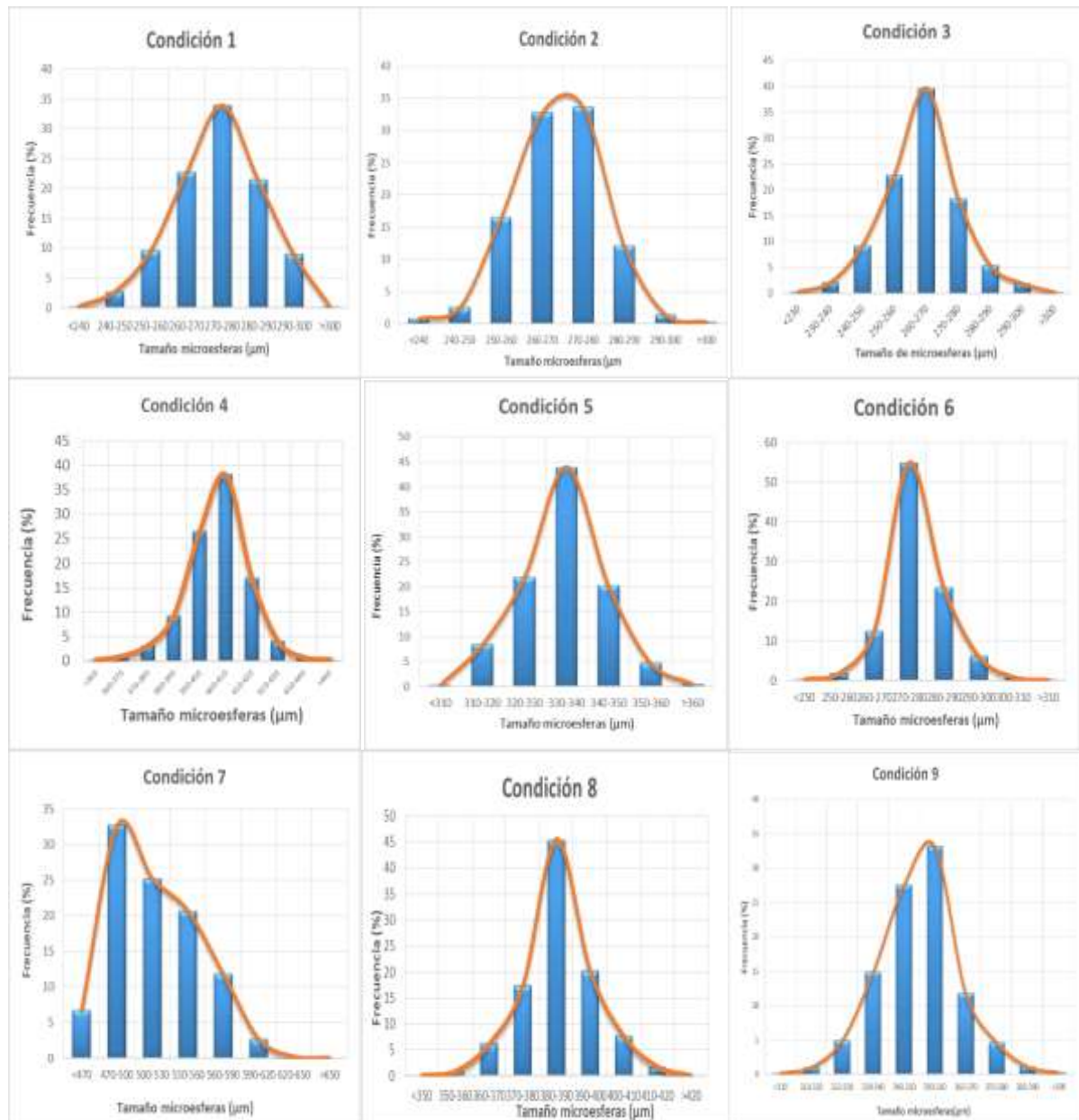


Figura A: Histogramas de las condiciones 1-9, ordenadas en orden ascendente, y de izda a dcha.

ANEXO II. ESPECTROS FTIR AMPLIFICADOS

En el siguiente anexo se presentan imágenes ampliadas del espectro FTIR aportado en el apartado 5.7.

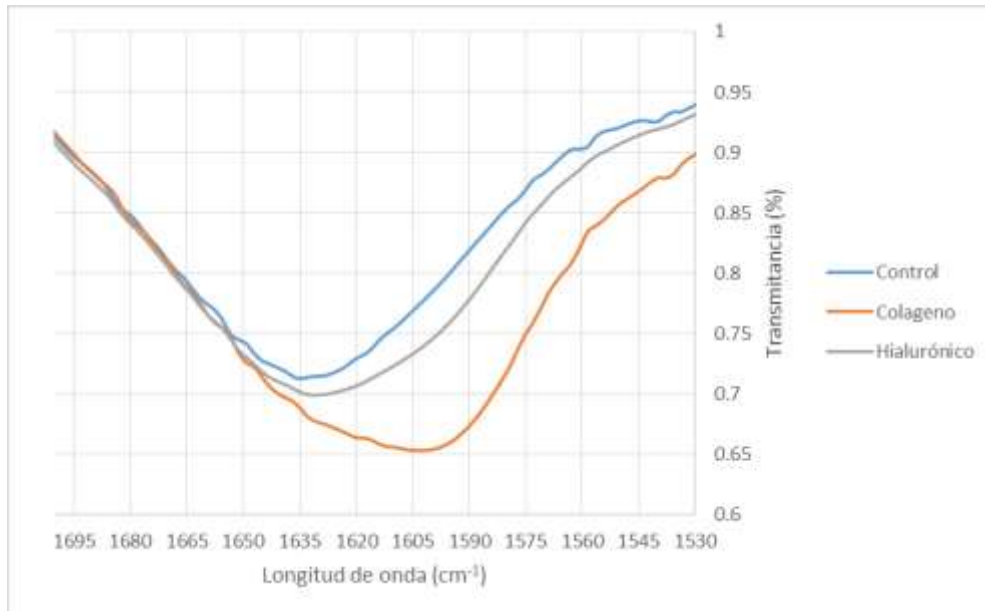


Figura B: pico característico del colágeno a 1600cm^{-1} , visualizado en las microesferas acabas en dicha biomolécula.

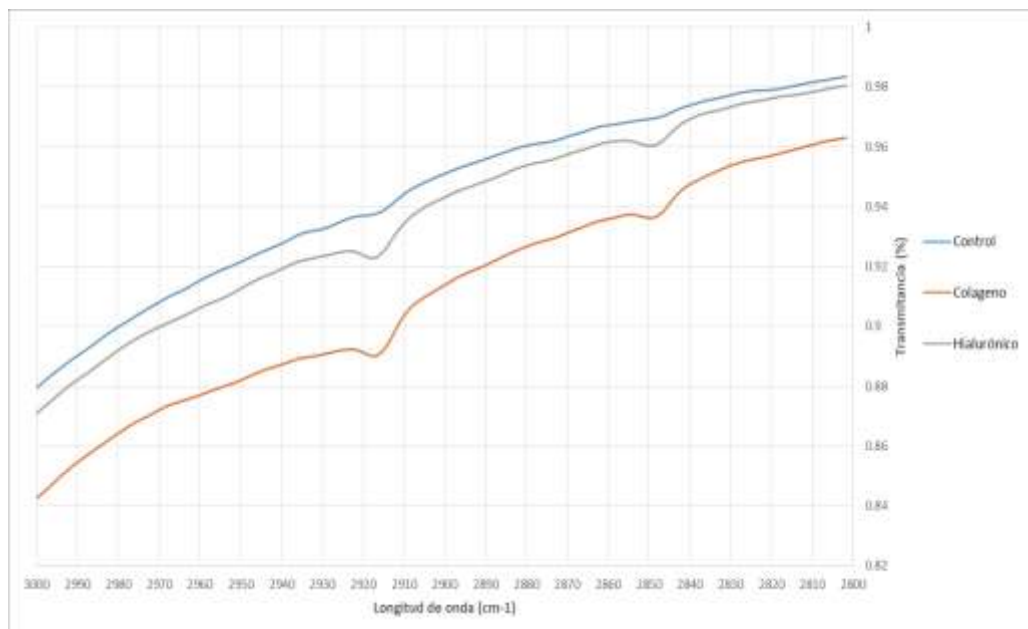


Figura C: picos característico del ácido hialurónico a 2915 y 2850 cm^{-1} . Se visualizan tanto en las microesferas cuya última capa es ácido hialurónico como en las que su último recubrimiento es Col.

ACLARACIÓN: El motivo por el cual se visualizan los picos característicos de la biomolécula que está en la penúltima capa es porque los recubrimientos han de tener un espesor inferior al que el equipo FTIR es capaz de detectar.

ANEXO III: ESTUDIO ESTADÍSTICO ANOVA

A continuación se adjuntan los resultados detallados del estudio ANOVA realizado

Tabla A: El análisis ANOVA fue realizado con un valor alpha de 0.05. Además se puede ver de qué manera influye cada factor evaluado en la siguiente tabla

2way ANOVA of Data 3:ANOVA results

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Table Analyzed	Data 3				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	3.406	<0.0001	****	Yes	
Tiempo	91.71	<0.0001	****	Yes	
Condicion cultivo	1.969	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	3411815901851	8	426476987731	F (8, 225) = 32.84	P<0.0001
Tiempo	91878696997535	2	45939348498767	F (2, 225) = 3537	P<0.0001
Condicion cultivo	1972632229684	4	493158057421	F (4, 225) = 37.97	P<0.0001
Residual	2922171854589	225	12987430465		

Tabla B: Datos estadísticos para cada condición de cultivo comparándola con el resto. Se puede consultar si la diferencia entre ambas condiciones es significativa, en la cuarta columna.

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<i>DÍA 2</i>					
Control vs. Microgel control	-22884	-136804 to 91036	No	ns	0.9998
Control vs. Microgel Col	-42191	-156110 to 71729	No	ns	0.9702
Control vs. Microgel HA	-74544	-188464 to 39376	No	ns	0.4927
Control vs. Microgel Col + HA	-99831	-213751 to 14089	No	ns	0.1311
Microgel control vs. Microgel Col	-19307	-133226 to 94613	No	ns	>0,9999
Microgel control vs. Microgel HA	-51660	-165580 to 62260	No	ns	0.8941
Microgel control vs. Microgel Col + HA	-76947	-190867 to 36973	No	ns	0.4465
Microgel Col vs. Microgel HA	-32353	-146273 to 81566	No	ns	0.9959
Microgel Col vs. Microgel Col + HA	-57640	-171560 to 56280	No	ns	0.8121
Microgel HA vs. Microgel Col + HA	-25287	-139207 to 88633	No	ns	0.9995
<i>DÍA 5</i>					
Control vs. Microgel control	-215131	-329051 to -101211	Yes	****	<0,0001
Control vs. Microgel Col	-159695	-273615 to -45775	Yes	***	0.001
Control vs. Microgel HA	-572724	-686644 to -458804	Yes	****	<0,0001
Control vs. Microgel Col + HA	-591798	-705718 to -477878	Yes	****	<0,0001
Microgel control vs. Microgel Col	55436	-58484 to 169356	No	ns	0.8453
Microgel control vs. Microgel HA	-357593	-471513 to -243673	Yes	****	<0,0001
Microgel control vs. Microgel Col + HA	-376667	-490587 to -262747	Yes	****	<0,0001
Microgel Col vs. Microgel HA	-413029	-526949 to -299109	Yes	****	<0,0001
Microgel Col vs. Microgel Col + HA	-432103	-546023 to -318183	Yes	****	<0,0001
Microgel HA vs. Microgel Col + HA	-19074	-132994 to 94846	No	ns	>0,9999
<i>DÍA 7</i>					
Control vs. Microgel control	-124576	-238495 to -10656	Yes	*	0.0222
Control vs. Microgel Col	-251692	-365612 to -137772	Yes	****	<0,0001
Control vs. Microgel HA	-145344	-259264 to -31424	Yes	**	0.0038
Control vs. Microgel Col + HA	35776	-78144 to 149696	No	ns	0.991
Microgel control vs. Microgel Col	-127117	-241036 to -13197	Yes	*	0.0181
Microgel control vs. Microgel HA	-20768	-134688 to 93152	No	ns	>0,9999
Microgel control vs. Microgel Col + HA	160352	46432 to 274271	Yes	***	0.0009
Microgel Col vs. Microgel HA	106348	-7571 to 220268	No	ns	0.0854
Microgel Col vs. Microgel Col + HA	287468	173548 to 401388	Yes	****	<0,0001
Microgel HA vs. Microgel Col + HA	181120	67200 to 295039	Yes	***	0.0001