



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

**Trabajo Final de Grado**

**Grado en Biotecnología (2016-2020)**

---

# DISEÑO DE MODELO 3D BASADO EN MICROGELES FUNCIONALIZADOS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DEL MIELOMA MÚLTIPLE EN BIORREACTOR DE PERFUSIÓN

---

**Autora:** María Muñoz Escribano

**Tutor:** José Luis Gómez Ribelles

**Cotutor:** Luis Amaro Martins

**Junio de 2020, València.**



Centre for Biomaterials  
and Tissue Engineering  
Universitat  
Politècnica de València



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

## **Diseño de modelo 3D basado en microgeles funcionalizados para el cultivo de células del mieloma múltiple en biorreactor de perfusión.**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica definida por la presencia de una paraproteína monoclonal como consecuencia de la proliferación de células plasmáticas monoclonales. Recrear el microambiente tumoral y los distintos eventos que tienen lugar conforme la enfermedad progresa es crucial para estudiar las rutas de señalización que conducen a la generación de resistencia a fármacos y desarrollar nuevas terapias antitumorales. Sin embargo, los modelos disponibles no consiguen reproducir fielmente el tumor ni las interacciones entre éste y su entorno, resultando en discrepancias entre las conclusiones preclínicas y la respuesta de los pacientes a los tratamientos.

El trabajo se plantea como un diseño de un modelo de plataforma de cultivo 3D de células de MM, basado en microesferas sintéticas funcionalizadas con biomoléculas de la matriz extracelular de la médula ósea, como el colágeno tipo I (Col I) y el heparán sulfato (HS), cuyo papel en la resistencia adquirida quiere ser estudiado.

En él se incluyen los protocolos de fabricación de cada uno de los elementos que componen la plataforma: las microesferas de alginato obtenidas mediante un sistema microfluídico y funcionalizadas mediante la técnica de *Layer-by-layer* (LbL) y un biorreactor de perfusión para la realización del cultivo celular automáticamente. Asimismo, el trabajo consta de un estudio en profundidad del estado del arte en relación con los modelos de enfermedad del MM.

**Palabras clave:** mieloma múltiple; microfluídica; microesferas; *Layer-by-layer*; cultivo tridimensional; biorreactor

**ALUMNA:** MARÍA MUÑOZ ESCRIBANO

**TUTOR:** JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

**COTUTOR:** LUIS AMARO MARTINS

Junio de 2020, València.

### **3D model design based on functionalized microgels for multiple myeloma cell culture in perfusion bioreactor.**

Multiple myeloma (MM) is a haematological neoplasia defined by the presence of a monoclonal paraprotein because of monoclonal plasmatic cell proliferation. Recreating the tumour microenvironment and the various events that occur as the disease progresses is crucial to study the signalling pathways that lead to drug resistance generation and to develop new antitumor therapies. However, available models fail to faithfully reproduce the tumour and tumour-niche interactions, leading to discrepancies between preclinical discoveries and the patient's response to treatments.

The work is presented as a design of a 3D MM cell culture platform model, based on synthetic microspheres functionalized with bone marrow extracellular matrix biomolecules, such as collagen type I (Col I) and heparan sulphate (HS), whose role in acquired resistance is aimed to be studied.

It includes the manufacturing protocols for each constituent element: the alginate microspheres obtained by means of a microfluidic system and functionalized by the Layer-by-layer technique (LbL) and a perfusion bioreactor to automatically perform the cell culture. The work also consists of an in-depth study of the state of the art in relation to MM disease models.

**Keywords:** multiple myeloma; microfluidics; microspheres; Layer-by-layer; three-dimensional cell culture; bioreactor

**STUDENT:** MARÍA MUÑOZ ESCRIBANO

**TUTOR:** JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

**COTUTOR:** LUIS AMARO MARTINS

Junio de 2020, València

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a José Luis. Gracias por ofrecerme la posibilidad de formar parte del equipo. Ni siquiera esta pandemia me ha impedido aprender tanto de cada uno de vosotros.

A Luis. Tu positividad, paciencia y ayuda en todo momento no puede agradecerse con mis escasos conocimientos de portugués. Tienes un corazón enorme.

A vosotras, chicas. La única razón por la que me plantearía volver a empezar. Gracias por hacer todo un poco más fácil.

“Perquè hi haurà un dia que no podrem més i llavors ho podrem tot.”

Vicent Andrés Estellés

# ÍNDICE

<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>2</b>
2.1. MIELOMA MÚLTIPLE	2
2.1.1. Clasificación molecular y epidemiología	2
2.1.2. Origen y patogénesis molecular	2
2.1.3. Evolución clonal	3
2.1.4. Sintomatología, criterio diagnóstico y pronóstico clínico	4
2.1.5. Tratamiento del mieloma múltiple	5
2.2. MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA	6
2.2.1. Mecanismos de generación de resistencia a las quimioterapias	7
2.2.2. Papel del colágeno tipo I y el heparán sulfato en la resistencia adquirida a quimioterapias	8 9
2.3. REVISIÓN DE LOS MODELOS DE MIELOMA MÚLTIPLE	10
2.3.1. Cultivo de células hematopoyéticas	10
2.3.2. Modelos 3D e ingeniería de tejidos	11
2.3.3. Modelización de las interacciones en la médula ósea	12
2.3.3.1. Médula ósea <i>on-a-chip</i>	13
2.3.4. Modelización en 3D del mieloma múltiple	13
<b>3. DISEÑO DE UN MODELO 3D BASADO EN MICROESFERAS DE ALGINATO FUNCIONALIZADAS</b>	<b>16</b>
3.1. HIPÓTESIS	16
3.2. MICROGELES DE ALGINATO COMO BIOMATERIAL	17
3.3. MICROFLUÍDICA PARA LA OBTENCIÓN DE MICROESFERAS	18
3.4. FUNCIONALIZACIÓN: TÉCNICA DE LAYER-BY-LAYER	19
3.5. BIORREACTOR DE PERFUSIÓN PARA EL CULTIVO CELULAR	20
3.5.1. El efecto del fenómeno de perfusión	21
<b>4. PROTOCOLOS DE FABRICACIÓN</b>	<b>22</b>
4.1. SISTEMA DE MICROFLUÍDICA: DISEÑO Y DESCRIPCIÓN	22
4.1.1. Impresión por deposición de material fundido (FDM)	23
4.1.2. Impresión por procesamiento digital de la luz (DLP)	23

4.2.	PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO	24
4.2.1.	Materiales	24
4.2.2.	Obtención de las microesferas de alginato	24
4.2.3.	Mantenimiento del sistema de microfluídica	25
4.2.4.	Caracterización y control de calidad	26
4.2.4.1.	Morfología y tamaño de las microesferas	26
4.2.4.2.	Evaluación de la estabilidad de las microesferas	26
4.3.	FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS	26
4.3.1.	Layer-by-layer para exhibir en la superficie cadenas de colágeno tipo I	26
4.3.2.	Layer-by-layer para exhibir en la superficie cadenas de heparán sulfato	27
4.3.3.	Caracterización y control de calidad	27
4.3.3.1.	Análisis cualitativo de colágeno y heparán sulfato: FTIR	27
4.3.3.2.	Análisis cuantitativo de colágeno: BCA	28
4.3.3.3.	Análisis cuantitativo de heparán sulfato: Azul de toluidina	28
4.3.3.4.	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	28
4.4.	BIORREACTOR DE PERFUSIÓN	29
4.4.1.	Diseño y fabricación	29
4.4.2.	Esterilización del biorreactor	31
4.4.3.	Cultivo celular	31
<b>5.</b>	<b>PRUEBAS DE CONCEPTO</b>	<b>32</b>
5.1.	CIRCUITOS DE MICROFLUIDICA	32
5.2.	MICROESFERAS DE ALGINATO	33
5.3.	FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS	35
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de una célula de MM. Comunicación bidireccional entre las células de MM y las BMSC que promueve la supervivencia de las células tumorales (a); rutas de transporte proteico necesarias para la producción de grandes cantidades de copias de inmunoglobulinas (b); antígenos de superficie que sirven como diana de anticuerpos monoclonales (c); translocaciones en las que está involucrada la IgH (d); rutas de señalización que se ven afectadas en el MM (e) (Morgan et al., 2012).	7
<b>Figura 2.</b> Estructura química del alginato. En la figura está representada una cadena polimérica con dos monómeros de ácido glucurónico (G) y dos monómeros de ácido manurónico (M). (Drury et al., 2004).	17
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso de entrecruzamiento iónico entre los cationes de $Ca^{2+}$ y dos polímeros de alginato a través de los residuos de $\alpha$ -L-glucurónico. (Figura adaptada a partir de "Chemical Bonds Using Polymers To Understand Chemical Bonds", 2020).	17
<b>Figura 4.</b> Representación de las distintas técnicas microfluídicas para la obtención de microesferas de gel. (Figura adaptada a partir de Choe et al., 2018).	19
<b>Figura 5.</b> Esquema de la influencia de la naturaleza de los canales sobre la morfología de las microesferas.	19
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica del proceso de funcionalización de microesferas basado en la técnica de Layer-by-layer. (Figura adaptada a partir de Shariki et al., 2012).	20
<b>Figura 7.</b> Comparación de los sistemas de cultivo hidrodinámicos y las posibilidades de estudio que ofrece cada uno. (Figura adaptada a partir de Fridley et al., 2012).	21
<b>Figura 8.</b> Diseño de la plantilla de los canales del circuito de microfluídica para su impresión tridimensional por FDM.	22
<b>Figura 9.</b> Diseño del molde del circuito de microfluídica para su impresión tridimensional por DLP.	23
<b>Figura 10.</b> Representación del sistema de microfluídica con indicaciones para conectar los tubos de entrada correspondientes al medio continuo y disperso y el tubo de salida.	24

<b>Figura 11.</b> Diagrama de la formación de microgotas de alginato en el sistema de microfluídica y su reticulación posterior en un baño de cloruro cálcico para la obtención de microesferas.	25
<b>Figura 12.</b> Diseño del molde del biorreactor para su impresión tridimensional por DLP.	29
<b>Figura 13.</b> Diseño del biorreactor de perfusión para el cultivo de células de MM en presencia de microesferas de alginato funcionalizadas.	30
<b>Figura 14.</b> Representación de los procesos de la manipulación de microesferas para el cultivo en el biorreactor de perfusión.	30
<b>Figura 15.</b> Dispositivo PDMS con un circuito de dimensiones de 10 x 20 mm y con una anchura de canal de 50 $\mu\text{m}$ .	32
<b>Figura 16.</b> Dispositivo PDMS con un circuito de dimensiones de 16,5 x 50 mm y con una anchura de canal de 500 $\mu\text{m}$ .	33
<b>Figura 17.</b> Imagen obtenida mediante el microscopio estereoscópico SMZ-140 de MOTIC de microesferas de alginato generadas por un sistema de microfluídica de flow-focusing de tamaño comprendido entre 70 y 250 $\mu\text{m}$ .	34
<b>Figura 18.</b> Imagen obtenida mediante el microscopio estereoscópico SMZ-140 de MOTIC de microesferas de alginato con ferrita de hierro en su interior, generadas por un sistema de microfluídica de flow-focusing de tamaño comprendido entre 70 y 250 $\mu\text{m}$ .	34
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica del espectro obtenido mediante FTIR de las microesferas funcionalizadas con Col I. Las flechas señalan los picos característicos de Col I y Alg.	35
<b>Figura A.</b> Dibujo técnico del circuito de microfluídica con un tamaño de canal de 500 $\mu\text{m}$ y dimensiones de 16,5 x 50 mm obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.	43
<b>Figura B.</b> Dibujo técnico del circuito de microfluídica con un tamaño de canal de 50 $\mu\text{m}$ y dimensiones de 10 x 20 mm obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.	44
<b>Figura C.</b> Dibujo técnico del biorreactor para el cultivo celular obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.	45

# ABREVIATURAS

ACS: American Cancer Society

AFM: Microscopía de fuerza atómica

Alg: Alginato sódico

ASCT: Trasplante de células madre autólogas (*Autologous Stem Cells Transplant*)

BCA: Ensayo de ácido bicinconínico (*Bicinchoninic acid assay*)

BM: Médula ósea (*Bone Marrow*)

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

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro cálcico

CAM-DR: Resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (*Cell-Adhesion Mediated Drug Resistance*)

Col I: Colágeno tipo I

DLP: Procesamiento digital de la luz (*Digital Light Processing*)

ECM: Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDA: *Food Drug Administration*

FDM: Deposición de material fundido (*Fused Deposition Modeling*)

FLC: Cadenas ligeras de inmunoglobulinas (*Free Light Chains*)

FN: Fibronectina

FTIR: Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

GMSI: Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto

HA: Ácido hialurónico

HS: Heparán sulfato

HSC: Células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*)

IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas (*Immunoglobulin heavy chain*)

IL-6: Interleuquina-6

IMIDs: Fármacos inmunomoduladores (*Immunomodulatory drugs*)

IMWG: *International Myeloma Working Group*

LbL: *Layer-by-layer*

LDH: Lactato deshidrogenasa

mAbs: Anticuerpos monoclonales (*Monoclonal Antibodies*)

MCR: Resistencia multicelular (*Multicellular resistance*)

MDR: Resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug resistance*)

min: minutos

MM: Mieloma Múltiple

MMP: Metaloproteinasas de matriz extracelular

MSC: Células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*)

NF-Kb: Factor nuclear kB

NK: *Natural killers*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPG: Osteoprotegerina

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

PDMS: Polidimetilsiloxano

PET: Tereftalato de polietileno (*Polyethyleneterephthalat*)

PIs: Inhibidores del proteasoma (*Proteasome Inhibitors*)

PLA: Ácido poliláctico

PLC: Policaprolactona

PLL: Poli(L-lisina)

s: segundos

SMM: Mieloma de desarrollo lento (*Smouldering Multiple Myeloma*)

SNV: Cambios nucleotídicos (*Single Nucleotide Variation*)

UP: Ultra pura

VAD: vincristina-doxorubicina-dexametasona

β2MG: beta-2-microglobulina

## 1. OBJETIVOS

El proyecto pretende desarrollar un entorno biomimético para el cultivo de células plasmáticas tumorales de modo que puedan estudiarse las vías de generación de resistencia a quimioterapias en pacientes de mieloma múltiple. En particular, este trabajo pretende diseñar el entorno que permita el estudio del papel del colágeno tipo I y del heparán sulfato, componentes relevantes de la matriz extracelular de la médula ósea, en el fenómeno de generación de resistencia a fármacos utilizando para ello líneas celulares de mieloma múltiple.

El entorno artificial de cultivo comprende tres elementos esenciales:

- Soporte de cultivo tridimensional constituido por microesferas.
- Injerto de las biomoléculas de interés en el soporte para su presentación a las células.
- Biorreactor con capacidad de dosificación de fármacos y flujo controlado.

El objetivo del proyecto es, por tanto, llevar a cabo un estudio completo del estado del arte en relación con los modelos existentes y el tratamiento de la enfermedad, así como una propuesta para cada uno de los elementos del modelo, incluyendo protocolos y pruebas de concepto hasta donde ha sido posible.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. MIELOMA MÚLTIPLE

#### 2.1.1. Clasificación molecular y epidemiología

El mieloma múltiple (MM) es una hemopatía maligna caracterizada por la proliferación clonal incontrolada de células plasmáticas, resultando en la invasión de la médula ósea hematopoyética y en la producción de una inmunoglobulina monoclonal en la mayoría de los casos (Manier *et al.*, 2019). A pesar de ser considerada una única enfermedad, es un conjunto de neoplasias de células plasmáticas citogenéticamente distintas. Se engloba dentro de las gammapatías monoclonales (GM), caracterizadas todas ellas por la proliferación de un clon de células B en los últimos estadios de la maduración, las células plasmáticas y los linfoplasmocitos. Sin embargo, cabe la diferenciación entre el concepto de proliferación clonal, en el cual se encuentra la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que puede desarrollarse durante años sin necesidad de tratamiento más allá de la observación, y el de proliferación neoplásica maligna, donde encontramos el MM (Rajkumar y Kumar, 2016).

Actualmente, representa del 1 al 2% de los cánceres y del 10 al 12% de las hemopatías malignas. Aproximadamente, el 40% de los casos de MM se caracterizan por la presencia de trisomías en las células plasmáticas neoplásicas mientras que la mayor parte del resto presenta translocaciones en el locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH). El MM raramente se diagnóstica antes de los 40 años, edad tras la cual la incidencia aumenta hasta los 84 años, siendo la edad media en el momento del diagnóstico de en torno a 70 años. Se han identificado ciertos factores de riesgo, tales como la obesidad, la dieta, el tabaco y el alcohol, o la exposición a pesticidas y radiaciones ionizantes. Además, ciertos casos familiares indican una posible predisposición genética. En particular, siete locus han sido asociados a alrededor del 13% del riesgo familiar de desarrollar MM (Alexander *et al.*, 2007; Manier *et al.*, 2019). La incidencia es del 5,6 en mujeres y del 8,7 en hombres por cada 100.000 personas, siendo la etnia subsahariana la que presenta una mayor predisposición (CANCER STAT FACTS: MYELOMA, 2020).

#### 2.1.2. Origen y patogénesis molecular

Diversos estudios han demostrado que el MM está casi siempre precedido por la GMSI, siendo su progreso hacia MM del 1% por año y existiendo entre ambos un estadio intermedio, conocido como mieloma de desarrollo lento o indolente (SMM – *Smouldering Multiple Myeloma* – por sus siglas en inglés) (Chng *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a que la GMSI es una enfermedad asintomática en la mayoría de los casos, sólo un 10% de los pacientes con MM recién diagnosticado tienen antecedentes de GMSI preexistente (Rajkumar y Kumar, 2016).

En la mayoría de los casos, las células del linaje de células B, incluyendo linfocitos B del centro posgerminal y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, sufren la transformación a células madre del mieloma mediante dos eventos iniciales, los cuales conducen al incremento y/o desregulación de la expresión de las ciclinas D1, D2 O D3, directamente o a través de factores de transcripción (Bergagsel *et al.*, 2009). El primero de ellos consiste en recurrentes traslocaciones cromosómicas en el locus IgH en 14q32, detectado en aproximadamente el 55% de los pacientes, siendo las translocaciones más frecuentes las que tienen lugar entre dicho locus y los oncogenes 11q13 (15-20%) y 4p16 (10-15%). El segundo

evento inicial es la hiperdiploidía cromosómica, caracterizada por una trisomía de los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19 y que se observa en hasta el 50% de los pacientes, incluyendo el 10% de aquellos que la presentan juntamente con translocaciones en 14q32 (Furukawa y Kikuchi, 2020). Sin embargo, estas transformaciones están presentes ya en GMSI, a veces incluso en pacientes que no progresan a MM durante muchos años, por lo que eventos genéticos secundarios, todavía sin identificar, son necesarios para que ocurra esta transición.

Varios estudios indican que la progresión de la enfermedad hacia MM está asociada con cambios genéticos adicionales como aneuploidías, cambios nucleotídicos (SNVs, por sus siglas en inglés – *Single Nucleotide Variation*) e inserciones y deleciones de pequeño tamaño (Dutta *et al.*, 2019). En concreto, se ha propuesto la importancia de la deleción del cromosoma 13 ( $\Delta 13$ ), especialmente en los subgrupos de pacientes que presentan traslocaciones directamente relacionadas con los genes de ciclinas D1 y D3 (Chieccio *et al.*, 2009). Por otro lado, la característica genética mejor caracterizada, presente en aproximadamente el 20-30% de los pacientes con MM recién diagnosticados y raramente localizada en GMSI, son mutaciones en los genes RAS. Lo mismo sucede con la activación de la expresión del gen MYC (15% de los pacientes recién diagnosticados), presente en casi todos los casos de MM con mutaciones en los genes RAS. Por ello, se ha insinuado una correlación en la activación de MYC y las mutaciones en dichos genes (Chng *et al.*, 2011).

En estados más avanzados de la enfermedad, las células del mieloma se caracterizan por una expresión constitutiva del factor nuclear kb (NF-kb) y por la presencia de deleciones en los genes que codifican para inhibidores de éste, adquiriendo de este modo la capacidad de crecimiento independiente del estroma y la formación de lesiones extramedulares en consecuencia. Asimismo, la progresión hacia estas etapas terminales es acompañada por la hipometilación del DNA (Furukawa y Kikuchi, 2020).

Recientemente, se ha sugerido que la activación de la expresión de CD56 (NCAM) en la mayoría de los pacientes con MM es un fenómeno relacionado con la transformación de las células plasmáticas, dado que esta molécula de adhesión no está presente en situaciones normales ni en pacientes con GMSI diagnosticado (Allegra *et al.*, 2019). De la misma manera, las células del mieloma presentan el receptor de IL-6 sobreexpresado. Esto provoca una sobreestimulación paracrina por parte de las células del estroma a través de dicha citoquina, dando lugar a alteraciones en el balance pro y antiapoptótico de las células plasmáticas y favoreciendo su expansión clonal desregulada (Naymagon y Abdul-Hay, 2016).

### **2.1.3. Evolución clonal**

A pesar de los avances terapéuticos en el MM y de la mejora significativa de recuperación por parte de los pacientes, las respuestas individuales a la terapia y la supervivencia global varían. El MM sigue siendo incurable, siendo la recaída una característica común de la enfermedad.

Estudios recientes han demostrado que la adquisición de mutaciones a nivel tumoral sigue un patrón no lineal, compatible con el modelo de la evolución de Darwin. En consecuencia, existe un cierto grado de heterogeneidad intraclonal, presente en todas las etapas del MM y que media la progresión de la enfermedad a través de la competición entre subclones y el crecimiento del más capaz. Se ha observado mediante estudios genómicos que los genes que presentan mutaciones de manera recurrente y que parecen ser los impulsores de la

transformación propia del MM a partir del GMSI son KRAS, NRAS, TP53, BRAF, FAM46C Y DIS3 (Dutta *et al.*, 2019).

Además, el tratamiento con medicamentos ejerce cierta presión selectiva y provoca un cambio en la arquitectura clonal. De este modo, aquellos clones más resistentes y/o malignos, que se encontraban a frecuencias indetectables durante el diagnóstico, sobrepasan al resto y favorecen la progresión y recaída de la enfermedad. Por tanto, dirigir el tratamiento hacia las mutaciones a nivel del clon ancestral o combinar terapias específicas para los diferentes subclones del paciente aumentará la probabilidad de remisión al prevenir el crecimiento y progresión de los subclones no tratados (Furukawa y Kikuchi, 2020; Fakhri y Ravi, 2016).

#### **2.1.4. Sintomatología, criterio diagnóstico y pronóstico clínico**

En su fase inicial, tras la transformación a partir de GMSI, el MM entra normalmente en una fase quiescente, caracterizada por un ritmo relativamente moderado de expansión clonal y ausencia de síntomas clínicos claros (SMM). A medida que la carga clonal se vuelve sustancial, las células plasmáticas neoplásicas (>10% del total de las células plasmáticas mononucleares) infiltran y dañan directamente los órganos mediante la producción masiva de cadenas ligeras monoclonales. Existe un amplio rango de síntomas que se manifiestan en consecuencia (Naymagon y Abdul-Hay, 2016).

La afectación ósea es una de ellas (80% de los pacientes) y ocurre debido a la sobreactivación de los osteoclastos mediada por las células del mieloma a través de la secreción de citoquinas. En consecuencia, los osteoclastos secretan IL-6, estimulando el crecimiento de las células del MM y contribuyendo a un bucle bidireccional (Brigel y Rogers, 2017). Otros síntomas que se presentan incluyen niveles elevados de creatinina sérica ( $\geq 2\text{mg/dL}$ ) (20%), hipercalcemia (15%), anemia, fallo renal, pérdida de peso y fatiga, entre otras. No obstante, el rasgo predominante en el MM es la presencia, en el suero o la orina, de una proteína monoclonal (M). El tipo de proteína M es IgG en el 50% de los pacientes, IgA en el 20%, IgD en el 2% y IgM en el 0,5%. Alrededor del 2-3% de los pacientes no presenta niveles de proteína M detectable, lo cual se conoce como MM no secretor.

En 2014, el *International Myeloma Working Group* (IMWG) añadió tres nuevos criterios a las manifestaciones mencionadas anteriormente, que permiten un diagnóstico temprano y el inicio de la terapia previo la presencia de afectación visceral. Estos son: presencia de células plasmáticas clonales de la médula ósea ( $\geq 60\%$ ), ratio de FLC  $\geq 100$  (del inglés *Free Light Chains* – cadenas ligeras de inmunoglobulinas circulando libremente en el suero) y  $>1$  lesión focal en imágenes por resonancia magnética (Rajkumar y Kumar, 2016).

Tanto los factores intrínsecos al paciente, los cuales reflejan su capacidad de tolerancia a la quimioterapia y el riesgo de complicaciones, como las características propias de los clones tumorales (citogenética, actividad proliferativa y carga tumoral) tienen un valor pronóstico. En 2015, el IMWG estableció tres grupos diagnósticos (estadío I, II y III) en base a los datos del IPI (que recoge los niveles de beta-2-microglobulina ( $\beta 2\text{MG}$ ) y albúmina), FISH (atendiendo al número y tipo de traslocaciones) y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) (Barreiro, 2017). En lo referente a las subclases, los pacientes que presentan hiperdiploidías suelen tener un mejor pronóstico que aquellos con traslocaciones (Brigel and Rogers, 2017).

### 2.1.5. Tratamiento del mieloma múltiple

El tratamiento del MM ha avanzado significativamente durante la última década debido a la aprobación de múltiples nuevos agentes, incluyendo inhibidores del proteasoma (PIs, del inglés – *Proteasome Inhibitors*), fármacos inmunomoduladores (IMiDs, del inglés – *immunomodulatory drugs*), anticuerpos monoclonales (mAbs), inhibidores de la histona deacetilasa y otros tratamientos en desarrollo como la terapia con células CAR-T (Bazarbachi *et al.*, 2019). Sin embargo, la efectividad de estas terapias se ve disminuida por la heterogeneidad intraclonal de los tumores, que permite la expansión de ciertos clones a medida que se erradican aquellos sensibles al tratamiento. Cabe destacar que el tratamiento está solamente indicado cuando la enfermedad se vuelve sintomática y no en fases previas (SMM), donde únicamente se requiere de observación clínica (Palumbo y Anderson, 2011).

Las fases más importantes del tratamiento son la terapia inicial, el trasplante de células madre autólogas (ASCT por sus siglas en inglés – *Autologous Stem Cells Transplant*) (en caso de ser admisible), terapia de mantenimiento y terapia de recaída. Aquellos pacientes indicados para ASCT normalmente reciben, previamente a éste, 4 ciclos de terapia inicial. Por otro lado, aquellos pacientes con MM de riesgo estándar que responden bien a la terapia inicial pueden optar a un ASCT tardío, por lo que las células madre obtenidas después de los cuatro ciclos serán criopreservadas para usos posteriores. Por el contrario, los pacientes no compatibles con un ASCT son tratados durante 12-18 meses. Tras la terapia inicial y/o el ASCT, se considera la terapia de mantenimiento y la duración de ésta en base a la presencia o ausencia de características citogenéticas de alto riesgo (Rajkumar y Kumar, 2016).

Las estrategias en las que se basa la terapia inicial dependen de la tolerancia al tratamiento que presente el paciente. Los pacientes jóvenes (<65 años) con baja comorbilidad son tratados con una alta dosis de quimioterapia y posterior ASCT, mientras que los pacientes más mayores, con comorbilidades de magnitud significativa, reciben una dosis moderada únicamente. En la última década, el régimen de inducción vincristina-doxorubicina-dexametasona (VAD) ha sido suplantado por regímenes basados en bortezomid y lenalidomida (PI e IMiD, respectivamente) por sus mejores ratios de respuesta/toxicidad. Por su parte, las terapias de mantenimiento están siendo testadas para ver en qué medida son efectivas y cuál es su dosis óptima, si bien hay un consenso en que la duración sea lo más breve posible para minimizar la toxicidad añadida (Naymagon y Abdul-Hay, 2016). En cuanto a la terapia de recaída, hay diferentes tratamientos disponibles, desde agentes citostáticos convencionales hasta los nuevos agentes mencionados con anterioridad, siendo normalmente aconsejable la combinación de más de un fármaco (Röllig *et al.*, 2014).

No obstante, en cada una de estas etapas, la edad biológica puede diferir de la edad cronológica, por lo que la elección del tratamiento y su dosis debe estar determinada por la consideración de ambas. (Palumbo y Anderson, 2011).

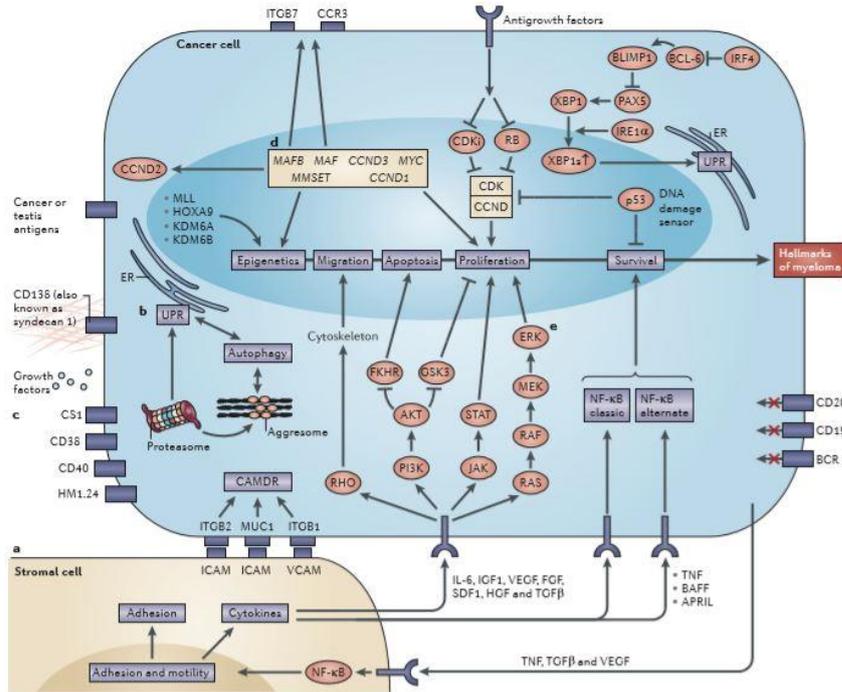
## 2.2. MICROAMBIENTE TUMORAL DE LA MÉDULA ÓSEA

Las mutaciones iniciales que generan clones de células plasmáticas tienen lugar en el centro germinal y, pese a que son consideradas necesarias para la oncogénesis, no son suficientes para que dichos clones se diferencien en células plasmáticas malignas. Estos eventos patológicos posteriores tienen lugar en la médula ósea (BM por sus siglas en inglés – *Bone Marrow*), cuyo microambiente, en el que coexisten una gran variedad de elementos celulares y no celulares, ha sido propuesto como un determinante clave de la progresión del MM.

El estroma de la BM comprende numerosos tipos de células diferenciadas no hematopoyéticas presentes entre los nichos especializados que la constituyen. Debido a esta localización intermedia, representan un medio de comunicación y desplazamiento de células, vital para crear un ambiente permisivo a la progresión de la enfermedad (Lomas *et al.*, 2020). Se ha demostrado que el microambiente tumoral de la BM promueve la proliferación clonal, el tráfico de células cancerígenas y desregula las vías apoptóticas mediante citoquinas y factores solubles (*Figura 1*). Estas citoquinas permiten la comunicación entre las células del mieloma y un diverso conjunto de células presentes en el nicho, incluyendo células estromales de la médula ósea (BMSC por sus siglas en inglés – *Bone Marrow Stromal Cells*), células madre mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés – *Mesenchymal Stem Cells*), osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales vasculares, fibroblastos, adipocitos, monocitos, células T y células NK. Asimismo, el fenotipo característico de las células neoplásicas está influenciado por interacciones directas célula-célula y célula-ECM (Naymagon y Abdul-Hay, 2016).

Bajo la influencia de características microambientales y de las células plasmáticas, como la hipoxia, la inflamación o la expresión de múltiples citoquinas y factores de crecimiento, las células endoteliales viran hacia un fenotipo angiogénico mediante la regulación positiva de varios genes cruciales y sus respectivas proteínas. Por otra parte, las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés – *Hematopoietic Stem Cells*) que residen en el endostio contribuyen también a esta vasculogénesis y angiogénesis, promoviendo la función protectora del nicho en el cual se encuentran las células plasmáticas. Asimismo, tanto las BMSC mediante la diferenciación a diferentes tipos celulares y la migración hacia ciertos sitios tumorales, como los adipocitos produciendo diversas citoquinas angiogénicas (VEGF, Ang-1 y -2, TNF $\alpha$ , FGF, TGF $\beta$ , HGF, IL-6 e IL-8) desempeñan un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad (Ria y Vacca, 2020).

De entre las diversas citoquinas que participan, la IL-6, producida principalmente por las BMSC y macrófagos, es esencial para la propagación y supervivencia de células plasmáticas tanto normales como patológicas, habiendo sido demostrada una expresión mayor del receptor de IL-6 en estas últimas. A medida que las células plasmáticas se adhieren a las BMSC y secretan citoquinas como TNF $\alpha$ , aumenta la secreción de IL-6, lo cual conlleva un ciclo de retroalimentación que permite la anulación de las señales apoptóticas inducidas, tanto por fármacos como por la estimulación con el ligando Fas que expresan las células T activadas (Dalton, 2003).



**Figura 1.** Diagrama de una célula de MM. Comunicación bidireccional entre las células de MM y las BMSC que promueve la supervivencia de las células tumorales (a); rutas de transporte proteico necesarias para la producción de grandes cantidades de copias de inmunoglobulinas (b); antígenos de superficie que sirven como diana de anticuerpos monoclonales (c); translocaciones en las que está involucrada la IgH (d); rutas de señalización que se ven afectadas en el MM (e) (Morgan et al., 2012).

### 2.2.1. Mecanismos de generación de resistencia a las quimioterapias

A pesar de haber fármacos efectivos disponibles para su tratamiento, la razón por la cual el MM está aún considerado como una enfermedad incurable es por la rápida aparición de resistencia a la quimioterapia. El papel del microambiente de la BM es fundamental durante la progresión de la enfermedad, dado que es modificado por las células plasmáticas para constituir un ambiente (angiogénesis, inhibición de células del sistema inmune, activación de osteoclastos, etc.) que permita su proliferación, migración, supervivencia y eventualmente, resistencia a los fármacos (Ria y Vacca, 2020).

En los pacientes tratados encontramos, por un lado, la resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés – *Multidrug resistance*). Este fenómeno está mediado por el bombeo activo del medicamento al exterior de la célula, por un aumento del metabolismo del fármaco o por mecanismos de crecimiento autocrinos y paracrinos que impiden la apoptosis. Por otro lado, se ha demostrado la capacidad que tienen los tumores de protegerse frente a medicamentos citotóxicos y radiaciones que dañan el DNA mediante un mecanismo conocido como resistencia multicelular (MCR, del inglés – *Multicellular resistance*). Normalmente, la transformación de células normales a malignas conlleva la pérdida de la inhibición por contacto y la habilidad de crecer independientemente de la adherencia, lo cual permite el desarrollo de tumores sólidos y la expansión y metástasis de éstos. Sin embargo, las células hematopoyéticas son una excepción, dado que, en estudios ex vivo, se ha observado cómo las células B normales son capaces de sobrevivir sin contacto extracelular, mientras que las células malignas evitan la

apoptosis mediada por el fármaco mediante la formación de agregados homotrópicos y uniones heterotrópicas con células del estroma de la BM (Dalton, 2003).

La ECM es el componente acelular más abundante del nicho de la BM y consta, principalmente, de fibronectina (FN), colágeno tipo I y IV, laminina y glicosaminoglicanos: heparán sulfato (HS), condroitin sulfato y ácido hialurónico (HA). Las células del MM se unen a algunos de estos componentes mediante moléculas de adhesión, como integrinas para la unión de laminina y FN, sindecano-1 para el colágeno tipo I y CD44 para el reconocimiento de HA. Dichas uniones conllevan la migración y diseminación de la enfermedad e influyen en otros aspectos como la resistencia a fármacos espontánea, conocida como resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR por sus siglas en inglés – *Cell-Adhesion Mediated Drug Resistance*) (Basak *et al.*, 2009). En contraposición a otros mecanismos de resistencia, que se desarrollan a lo largo de la enfermedad, se piensa que esta resistencia ocurre *de novo* en pacientes sin tratar y se ha demostrado que se inicia con la adhesión de las células del mieloma a FN mediante receptores de integrinas. Los receptores que suelen sobreexpresar las células del mieloma humanas son, principalmente, VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) y VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) y otros como  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 4\beta 7$ , menos frecuentemente. Dicha adhesión conduce a un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, de modo que se inhibe la actuación de medicamentos cuya diana es la replicación del DNA, mientras que su disrupción mediante anticuerpos anti- $\beta 1$  permite la progresión hacia la fase S y la reversión del fenotipo resistente a fármacos (Hazlehurst *et al.*, 2000; Damiano *et al.*, 1999).

Otros eventos que pueden mediar CAM-DR son la redistribución de la topoisomerasa II en respuesta a fármacos que impiden su actuación en la replicación del DNA y mutaciones en el receptor del antígeno Fas de las células T. Además, se ha demostrado que cuando las células de mieloma se encuentran con células dendríticas, producen CD28, una molécula señalizadora del sistema inmunitario que les confiere protección frente al tratamiento (Hughes, 2011).

Por tanto, la resistencia farmacológica puede ser resultado de mecanismos intrínsecos por los cuales las células son resistentes incluso antes del tratamiento, o adquiridas durante la terapia (presión selectiva). Por el momento, la razón por la que los pacientes recaen y cómo ciertos clones persisten tras las terapias no se conoce completamente (Pinto *et al.*, 2020).

### **2.2.2. Papel del colágeno tipo I y el heparán sulfato en la resistencia adquirida a quimioterapias**

La ECM es una parte importante del microambiente celular y, junto con diversos factores de crecimiento, participa en la regulación del desarrollo y diferenciación celular. Además, se ha sugerido la posibilidad de que varios de sus componentes confieran a las células tumorales resistencia a diferentes fármacos.

El colágeno tipo I es una de las principales proteínas que componen esta matriz, y promueve la adhesión, la diferenciación de osteoblastos y la mineralización de las MSC (Mathews *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha relacionado la evolución del MM con la cantidad de Col I en la ECM, siendo mayor en etapas tempranas y disminuyendo a medida que aumenta la plasmocitosis (Tancred *et al.*, 2009). Asimismo, encontramos proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular, entre la matriz extracelular o como moléculas solubles en los fluidos del tejido conectivo y en la circulación, siendo estos últimos el resultado de moléculas desprendidas de la superficie celular o proteoglicanos secretados.

El HS puede unirse a proteínas de la ECM y mediar interacciones célula-célula y célula-ECM, así como regular comportamientos celulares en procesos tanto normales como patológicos a través de la unión a moléculas bioactivas como los factores de crecimiento o las quimiocinas. Estas características posicionan a los proteoglicanos de HS en vías de señalización que se desregulan a lo largo de la enfermedad, incluyendo vías tan importantes como algunas de las involucradas en el crecimiento y progresión de la enfermedad.

Se ha demostrado la importancia del sindecano-1 (proteoglicano de HS más abundante y en ocasiones el único presente en la superficie de las células del MM) en la regulación del microambiente de la BM para promover el crecimiento y la metástasis del MM, regulando vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina, implicada además en la resistencia a quimioterapias (Ren *et al.*, 2018). Su expresión (CD138) se ha convertido en un marcador estándar para la identificación de células del mieloma, siendo característico de la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y promovido por el ambiente de la BM tanto en células normales como tumorales.

El sindecano-1 media la adhesión de las células del mieloma a Col I y uniones entre ellas, y se ha demostrado que un alto nivel de éste en el suero funciona como predictor de un mal pronóstico de la enfermedad. Esta forma soluble promueve el crecimiento y metástasis de las células en el hueso y está relacionado con un incremento en la densidad de capilares tumorales. Asimismo, participa en la modulación del microambiente del mieloma mediante eventos como la unión a la osteoprotegerina (OPG), un inhibidor de osteoclastos que es degradado, promoviéndose así la osteoclastogénesis y la destrucción ósea propias de la enfermedad (Ridley *et al.*, 1993; Sanderson y Yang, 2008).

### **2.3. REVISIÓN DE LOS MODELOS DE MIELOMA MÚLTIPLE**

La mayoría de los avances en la comprensión del MM han sido posibles gracias a líneas celulares de MM, constituidas por líneas celulares derivadas de pacientes con MM, plasmacitoma y leucemia de células plasmáticas. Una característica que las distingue es la capacidad de proliferar continuamente en cultivo, evitando la apoptosis y deteniendo su desarrollo. Esta propiedad las hace idóneas para estudios biológicos, etiológicos y terapéuticos de la enfermedad. Sin embargo, existe una cierta controversia en cuanto a las extrapolaciones que pueden obtenerse de dichos estudios en relación con los tumores originales. Para que estas conclusiones sean lo más fidedignas posible, el primer requisito es establecer la línea celular derivada de células tumorales y no a partir de linfocitos normales que pueden residir en el tumor, lo cual hace de las células del MM (y de enfermedades relacionadas) unas de las más complicadas a la hora de establecer cultivos continuos (Drexler *et al.*, 2000).

La manera en la que el tumor interactúa con el microambiente que lo rodea afecta tanto a su desarrollo como a la sensibilidad a los distintos fármacos, siendo especialmente relevante la comunicación de las células del MM y MSC a través de la producción masiva de factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas. Sin embargo, esta respuesta a fármacos puede verse sobreestimada en cultivos 2D, dando lugar a discrepancias entre los descubrimientos preclínicos y los resultados clínicos posteriores. Asimismo, los modelos animales que existen no son adecuados para predecir la respuesta a fármacos en humanos debido a las diferencias entre especies. Los modelos *in vitro* 3D, no obstante, reproducen fielmente el tumor dentro de su entorno, simulando interacciones y señalización entre éste y el

estroma, por lo que su disponibilidad es esencial para dilucidar la patogénesis del MM y el papel de las diversas interacciones en su progresión (Belloni *et al.*, 2017; Spelat *et al.*, 2020).

Recientemente, sin embargo, el foco de atención ha recaído en la tecnología *organ-on-a-chip*, que ofrece la posibilidad de mantener la fisiología deseada en un microambiente controlado y similar al del tejido. De esta manera, con la ayuda de la ingeniería de tejidos y la investigación de células madre se están desarrollando modelos de enfermedad basados en chips con un nivel fisiológico suficiente para el *screening* de fármacos y la medicina personalizada (Rothbauer *et al.*, 2019).

### **2.3.1. Cultivo de células madre hematopoyéticas**

Comúnmente, los cultivos celulares de HSC se realizaban en placas, que podían estar o no recubiertas de componentes de la ECM (fibronectina, laminina o colágeno), en un medio líquido con nutrientes y factores solubles. Sin embargo, estas condiciones de cultivo difícilmente reflejan el complejo entorno en el que se encuentran las HSC. Por ello, dado que se ha estudiado la diversidad mecánica en diferentes puntos de la BM y la localización de nichos especializados de HSC, se ha sugerido que estas señales biofísicas extrínsecas podrían ser importantes en su desarrollo. En consecuencia, la adición al cultivo de señales mecánicas y/o estructurales inspiradas en los nichos ha ido ganando cierto interés (Choi *et al.*, 2015; Lee-Thedieck y Spatz, 2012). Una gran variedad de biomateriales sintéticos y naturales se han utilizado para intentar recrear los nichos de la BM, incluyendo la policaprolactona (PCL), la fibrina y el colágeno. Sin embargo, ninguno de ellos se ha convertido en el estándar.

El cocultivo de HSC con poblaciones de células del nicho (comúnmente denominadas '*feeder cells*') promueve su crecimiento y diferenciación *in vitro* y es la estrategia predominante en investigaciones enfocadas a la diferenciación inducida de HSC a linajes linfoides o mieloides (Choi *et al.*, 2015). La habilidad de los diferentes tipos celulares para promover el mantenimiento de las células HSC depende de su capacidad de aportar o inducir las señales correspondientes. Estas señales incluyen moléculas de adhesión celular, ECM secretada, factores de crecimiento y ligandos de receptores de transducción de la señal. Mientras que los factores de crecimiento pueden ser suministrados al cultivo, biomateriales libres de células que mimeticen las interacciones entre las HSC y el nicho, y las poblaciones celulares que encontramos en éste, aún se encuentran en desarrollo (Lee-Thedieck y Spatz, 2012).

Por otro lado, dado el papel que desempeñan las MSC en el nicho de la BM promoviendo el mantenimiento de HSC CD34+, la mayoría de los estudios del momento se centran en el cocultivo de MSC y HSC. En estos estudios, se han encontrado dos tipos de compartimentos de HSC: uno en la superficie estromal de las MSC, donde predomina la proliferación, y otro bajo las MSC, que mantiene a las HSC en un estado más quiescente e inmaduro.

Otras modificaciones en las condiciones de cultivo que se han llevado a cabo son la disminución de la concentración de oxígeno para simular la hipoxia y la introducción de un flujo de fluido para estimular mecánicamente. El cultivo de MSC en hidrogeles, donde predomina la hipoxia, ha permitido el mantenimiento de las HSC en un estado más primitivo, mientras que la perfusión del cultivo en *scaffolds* de hidroxiapatita mejoran la capacidad de colonizar de las HSC en biorreactores de fibras huecas (Chramiec *et al.*, 2019).

### 2.3.2. Modelos 3D e ingeniería de tejidos

Tradicionalmente, los modelos basados en cultivos 2D y los modelos animales se han utilizado con el fin de dilucidar los mecanismos celulares que llevan a la progresión de las enfermedades humanas. Sin embargo, en los últimos años, la importancia de los cultivos 3D se ha incrementado, dando lugar a una nueva era en la investigación de los cultivos celulares, en la que los modelos 3D *in vitro* se plantean como el puente entre los cultivos 2D y los modelos animales *in vivo*. Eventos clave del ciclo vital de las células, tales como la proliferación, migración y apoptosis, están regulados por el contexto celular y las interacciones de la célula con el entorno a través de señales mecánicas y bioquímicas. Estas interacciones fisiológicas que mantienen la especificidad y homeostasis del tejido pueden reestablecerse de un modo similar a lo que ocurre *in vivo* mediante los cultivos 3D. Además, debido a que la ECM afecta a la estructura de la cromatina y, con ello, a la expresión génica está demostrado que los genes que se encuentran regulados positivamente en el cultivo 2D son distintos a aquellos de los cultivos 3D, estando estos últimos también expresados en los tumores. Actualmente, los cultivos 3D se utilizan en una gran variedad de estudios relacionados con la biología tumoral, incluyendo estudios de adhesión, migración y morfogénesis celular (Pampaloni *et al.*, 2007; Vanderburgh *et al.*, 2017).

Los *scaffolds* empleados en la actualidad, por sí solos o personalizados con secuencias específicas de aminoácidos que sean reconocidas por los receptores celulares de adhesión, son capaces de guiar el desarrollo de los tejidos obtenidos por ingeniería tisular, pudiendo del mismo modo servir como soporte mecánico durante la posible implantación *in vivo*. Como biomateriales para su construcción, se utilizan polímeros sintéticos y naturales, materiales inorgánicos bioabsorbibles, combinaciones de éstos y tejido descelularizado (Pina *et al.*, 2019).

Entre las clases de *scaffolds* más empleados en la ingeniería de tejidos, encontramos los microgeles, micropartículas de hidrogel que pueden ser moldeadas en función del biopolímero del cual derivan y los métodos de fabricación y entrecruzamiento utilizados. Comúnmente, han servido como transportadores de moléculas bioactivas necesarias para guiar la reconstrucción tisular, sin embargo, en estudios *in vitro* recientes, se han entrecruzado distintos microgeles u obtenido mediante impresión 3D para la generación de *scaffolds* tridimensionales que promuevan el crecimiento celular. Pueden obtenerse a partir de diversos materiales, desde polímeros sintéticos como el polietilenglicol (PEG) hasta polisacáridos naturales como el quitosano o el alginato. Variando su composición, se pueden obtener distintas propiedades mecánicas, que permitirán cierto control sobre la respuesta celular (Newson *et al.*, 2019).

Se ha demostrado la capacidad de células como las BMSC para adherirse y crecer en la superficie de microesferas de quitosano, formando uniones entre partículas y pequeños agregados célula-microesfera y manteniendo una correcta morfología. Por un lado, las células son las que mantienen unidas a las microesferas, pero es a la vez dicha unión la que permite al quitosano actuar como *scaffold* 3D. Este modelo, a diferencia de los soportes 3D convencionales, es compatible con la dinámica celular, permitiendo el desplazamiento de las micropartículas a medida que se extiende el tejido (García Cruz *et al.*, 2008). Del mismo modo, micropartículas de alginato se han utilizado para encapsular células vivas, permitiendo la monitorización de cada una de ellas o su manipulación para estudios de reparación tisular. Asimismo, dichas microesferas se han utilizado para la recreación de la estructura de tejidos y órganos, formando grandes construcciones mediante la unión de microgeles (Utech *et al.*, 2015).

Por tanto, debido a su relevancia a nivel fisiológico, los modelos celulares tridimensionales se presentan como potenciales herramientas fundamentales en la

investigación de la biología celular. Dichos cultivos organotípicos podrían servir como alternativa a los modelos animales en la medicina personalizada y en ensayos de toxicidad de fármacos a gran escala, siendo por tanto una opción interesante tanto a nivel ético como económico (Pampaloni *et al.*, 2007).

### **2.3.3. Modelización de las interacciones en la médula ósea**

El estudio de en qué medida participan los mecanismos paracrinos en la patogénesis, progresión y resistencia a tratamientos del MM, requiere del desarrollo de modelos *in vitro* que determinen las contribuciones individuales de los tipos celulares a la respuesta global. En este sentido, se ha observado la importancia de los receptores de quimiocinas y sus ligandos en la migración de las células plasmáticas (tanto desde la BM como hacia ésta), así como en su quimiotaxis. Las células del MM expresan una gran variedad de estos receptores y secretan diversas quimiocinas, lo cual influye en su localización celular, progresión y el crecimiento del tumor.

Por un lado, se ha demostrado la existencia de similitudes en moléculas reguladoras de señalización y de interacciones célula-célula entre las HSC y las células de MM. Algunas de las principales rutas de señalización y moléculas comunes en ambos nichos son el eje CXCL12/CXCR4, que media su mantenimiento y localización; la ruta mediada por IL-6 para el control del crecimiento y supervivencia; y el eje VCAM1/VLA4, que las retiene en el nicho (Jakubikova *et al.*, 2016). En el cocultivo con MSC, por su parte, se ha observado una sobreexpresión de CX3CR1, quimiocina que promueve la cooperación entre células de MM y osteoclastos, para garantizar que las células tumorales se adhieran a la ECM del hueso y la enfermedad progrese. Del mismo modo, las MSC participan en la regulación positiva del activador del receptor de NF- $\kappa$ B y en la expresión de la activina A, lo cual promueve la osteoclastogénesis a la vez que inhibe la osteoblastogénesis. Asimismo, el cocultivo con MSC provoca un incremento en la expresión de citoquinas como IL-6 e IL-10, que promueven la progresión de las células tumorales mediante la activación del factor de transcripción Stat3. Todo ello sugiere que la comunicación entre MSC y células de MM es crucial para la interacción con osteoclastos y la diferenciación de éstos, resultando en la lesión ósea característica del MM (Spelat *et al.*, 2020; Dabbah *et al.*, 2016).

Por otro lado, estudios revelan que las alteraciones genéticas constitutivas de las células del mieloma no son las únicas que determinan su comportamiento biológico en el microambiente de la BM, sino que los perfiles moleculares dan lugar a cambios a nivel transcripcional y genómico que median ciertos efectos protectores del nicho. Por tanto, el estudio del oncogenoma podría servir para mostrar las interacciones específicas con el entorno de cada subtipo de MM (Hideshima *et al.*, 2007).

Dadas estas evidencias, la generación de modelos que recrean el microambiente y las interacciones entre éste y el tumor es una de las áreas emergentes más prometedoras en el campo de la biología del cáncer. La BM, por su parte, no puede ser considerada como un nicho individual sino como un conjunto de nichos que se ajustan a las necesidades de las distintas células y su estado de maduración. Por ello, el estudio de estas interacciones no sólo facilitará la comprensión de la patogénesis del MM, sino que permitirá establecer modelos *in vitro* e *in vivo* más efectivos para identificar y validar dianas moleculares personalizadas (Basak *et al.*, 2009).

### 2.3.3.1. Médula ósea on-a-chip

Los *organs on chips*, sistemas microfluídicos utilizados para el cultivo celular, se realizan con vidrios inorgánicos o polímeros, como el polidimetilsiloxano (PDMS), y con microcanales en los que se encuentran cultivadas las células. Son capaces de simular tejidos u órganos, en función de la complejidad de los canales y de la combinación de tipos celulares. Estos *organs on chips* pueden reproducir el nivel de respuesta del órgano al medicamento y mimetizar enfermedades como el cáncer, modelizando aspectos clave de la enfermedad como el crecimiento tumoral, la progresión de etapas tempranas a tardías, la invasión, la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima y la metástasis. Además, ofrecen una organización espacial mejorada con respecto a otros modelos *in vitro* mediante la compartimentación y el control de la difusión de factores solubles. De esta manera, interacciones con el estroma tumoral, con los vasos que rodean el tumor o con componentes no celulares como la ECM y las quimiocinas pueden ser estudiadas a tiempo real (Swayden *et al.*, 2020; Pyo *et al.*, 2020). Estos sistemas, pueden también ser flexibles y contener cámaras huecas en los laterales, a través de las cuales puede aplicarse una succión cíclica que mimetice las señales mecánicas del tejido, además de replicar el flujo de fluidos y las fuerzas tangenciales importantes a nivel fisiológico (Sontheimer-Phelps *et al.*, 2019).

El primer modelo obtenido mediante ingeniería tisular que consiguió recrear las proporciones de HSC presentes *in vivo* mantenidas autónomamente durante un mínimo de 1 semana fue un modelo de médula ósea en *chip* (BM *on-a-chip*) desarrollado en 2014 por Torisawa *et al.*, obtenido a partir de PDMS, colágeno para recubrir la microcavidad del sistema, restos óseos desmineralizados y proteínas morfogenéticas del hueso. El sistema se implantó subcutáneamente en un ratón huésped para repoblarlo con todos los componentes celulares de la BM y, tras 8 semanas, fue devuelto a la plataforma de microfluídica. Recientemente, sin embargo, gracias al conocimiento proporcionado por los modelos 3D, Sieber *et al.* han desarrollado la primera BM *on-a-chip* humana libre de sustancias xenogénicas, donde se ha conseguido prolongar el cultivo de células viables hasta 4 semanas. Consiste en el cocultivo de MSCs y HSCs en un scaffold de cerámica cubierto con hidroxiapatita, lo cual da cabida a la vascularización, dado que el material de cobertura promueve la formación de redes microvasculares (Chramiec *et al.*, 2019).

Con todo esto, si bien la utilización de estas tecnologías será de gran importancia para comprender cómo se relacionan las HSC con la ECM que las rodea, éstas pueden también aplicarse en estudios enfocados a las interacciones que tienen lugar en distintas enfermedades de la BM con dicho entorno. Esta posibilidad no sólo ayudará a dilucidar los mecanismos de dichas enfermedades, sino que permitirá predecir con mayor exactitud la respuesta de los pacientes a los diferentes tratamientos.

### 2.3.4. Modelización en 3D del mieloma múltiple

En los últimos años, ha aumentado el número de estudios que evidencian la importancia tanto de la matriz (en función de su compactación, geometría, química y dimensión espacial), como de los factores solubles y las células vecinas en la formación y comportamiento de los tejidos. En este contexto, los modelos 3D *in vitro* ofrecen la posibilidad de cultivar células humanas de MM en un sistema que simula de manera muy próxima el ambiente *in vivo* de la BM. Además, pueden incluirse tanto distintos tipos celulares presentes en la BM, como células

del mieloma derivadas de distintos pacientes, por lo que pueden ser usados para el *screening* de fármacos en un entorno personalizado (Reagan *et al.*, 2014).

El primer avance en la ingeniería de tejidos fue el cultivo basado en Matrigel (estándar en el cultivo de células derivadas de pacientes, pese a la falta de tenacidad y a su origen murino) desarrollado por Kirshner *et al.* en 2008, que permitió la primera expansión clonal *ex vivo* de células plasmáticas de MM y el análisis de la especificidad antitumoral de fármacos atacando compartimentos clonales individualmente. Además, supuso un antes y un después en el estudio del efecto de la heterogeneidad entre pacientes presente en el nicho de la BM, debido a la dependencia previa existente de líneas celulares y células primarias disponibles para ello.

Sin embargo, la aplicación clínica exitosa de fármacos quimioterapéuticos depende en gran parte de que la respuesta del paciente sea lo suficientemente predecible a partir de simulaciones *in vitro*. Los modelos 3D emulan la morfología celular, las interacciones entre células y de éstas con la matriz y fisiológicamente tienen una mayor utilidad en la predicción de respuestas a fármacos en cánceres heterogéneos, como es el caso del MM. En este sentido, el desarrollo de nuevas tecnologías como el *bioprinting* y los chips de microfluídica han ayudado a mimetizar de un modo más similar el microambiente tumoral y la fisiología de los tejidos, contribuyendo a dicha predicción (Radhakrishnan *et al.*, 2020).

El uso de biorreactores en los modelos de tumores derivados de pacientes ha servido para prolongar la vida de los modelos 3D y la adición de fuerzas cortantes mediante sistemas de perfusión ha permitido la mejora de transferencia tanto de fluidos por convección como de masa. Además, gran parte de los modelos basados en microfluídica han intentado recrear mediante microvasos obtenidos por ingeniería tisular la angiogénesis (el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos existentes), un evento crucial en el desarrollo del cáncer; así como la neovascularización, requerida para que haya una progresión desde la hiperplasia hacia la neoplasia, representando ambas elementos importantes a la hora de restringir la progresión y el crecimiento de la enfermedad (Bray *et al.*, 2019; Sontheimer-Phelps *et al.*, 2019).

Ferranini *et al.* mantuvieron cultivos dinámicos derivados de pacientes de MM en un biorreactor, mediante los cuales demostraron la importancia de ciertos componentes del nicho de la BM en la viabilidad de estas células (Chramiec *et al.*, 2019). Más tarde, Zhang y colaboradores desarrollaron un modelo ortotópico para el estudio del crecimiento del MM dependiente de la señalización del microambiente de la BM. El sistema microfluídico de perfusión se diseñó con el fin de incorporar un *scaffold* que simulase el hueso. Dicho *scaffold* fue producido mediante el cultivo de osteoblastos en la cámara de microfluídica 4 días antes de ser usado y serviría a modo de soporte en el posterior cultivo de células mononucleares de la BM obtenidas de pacientes de MM. Este microambiente promovió la proliferación de las células de mieloma a través de interacciones de éstas con los osteoblastos, confirmando por tanto que la superficie endostial es crucial en el crecimiento y mantenimiento de las células de MM, las cuales se mantuvieron viables durante más de 3 semanas. (Zhang *et al.*, 2014).

En 2015, de la Puente *et al.* generaron un modelo de BM mediante un cultivo en 3D derivado del sobrenadante de la BM de pacientes de MM. De esta manera, consiguieron recrear la interacción entre células del mieloma, BMSC y células endoteliales. Asimismo, el oxígeno y los fármacos a examinar se suministraron en forma de gradiente, e indujeron resistencia a dichos medicamentos en el modelo. Con todo ello, se consiguió que tanto la complejidad espaciotemporal como el número de tipos celulares implicados aumentase considerablemente (Chowdury *et al.*, 2019). Del mismo modo, Pak *et al.*, mediante otro sistema microfluídico de

perfusión, cocultivar células CD138 - y CD138 + (células de MM) del mismo paciente, y llevaron a cabo un ensayo de quimiosensibilidad y resistencia, permitiendo la predicción de pacientes no respondedores a bortezomid.

Por tanto, la importancia de usar modelos tridimensionales en lugar de bidimensionales para recrear la BM y las propiedades especializadas que ésta adquiere en pacientes con MM se ha demostrado mediante *scaffolds* de distintos materiales, cultivos basados en el uso de biorreactores y sistemas microfluídicos. Sin embargo, aún se requiere el desarrollo de estudios adicionales para mimetizar e investigar el nicho del MM. En este contexto, la integración de construcciones organotípicas que simulen la fisiología del tejido en plataformas de microfluídica se presenta como un reto, a la vez que emerge como el modelo *in vitro* más relevante en esta nueva era de medicina personalizada, donde los objetivos se centran en dilucidar los mecanismos patológicos específicos de paciente y predecir su respuesta a fármacos quimioterapéuticos.

### **3. DISEÑO DE UN MODELO 3D BASADO EN MICROESFERAS DE ALGINATO FUNCIONALIZADAS.**

Las interacciones entre la ECM y las células del MM dan lugar a fenómenos de adhesión, migración y desarrollo de la enfermedad, sin embargo, también influyen otros aspectos de la fisiología de las células del mieloma. De entre estos, el fenómeno conocido como CAM-DR es el resultado más relevante desde el punto de vista clínico y ha sido, por el momento, demostrado como resultado de la interacción de las células tumorales con FN y HA. No obstante, existen evidencias de la adhesión de las células del mieloma a otros componentes de la ECM. En el caso del Col I, ésta tiene lugar mediante la molécula de adhesión sindecano-1 (CD138), un proteoglicano naturalmente presente en la superficie de las células de MM, pero que puede liberarse y encontrarse en la ECM de la médula ósea o en regiones de fibrosis medular. Su estructura consta de una proteína central y moléculas de HS unidas covalentemente a ésta, a través de las cuales se une a proteínas de la ECM y media interacciones célula-célula y célula-ECM. Además, se ha observado que juega un papel similar al HA en el nicho de la BM, uniéndose también a moléculas bioactivas como IL-6, IL-7, IL-8, HGF, FGF-2, VEGF o ligandos de la familia EGF, muchas de las cuales son potentes factores de crecimiento involucrados en el MM. Uno de los eventos en los que se ha demostrado su participación es en la osteoclastogénesis y en la destrucción ósea característica del MM mediante la unión y degradación de la osteoprotegerina (OPG), un inhibidor de osteoclastos (Basak *et al.*, 2009; Sanderson y Yang, 2008).

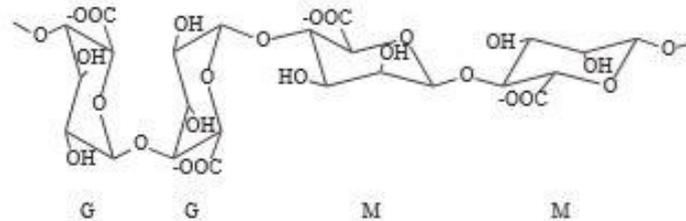
En este contexto, surge la idea de diseñar un modelo de enfermedad basado en el cultivo 3D de células del mieloma a partir de microesferas de alginato, funcionalizadas con biomoléculas propias de la ECM de la BM. En un proyecto anterior se estudió el papel del HA y el Col I en la resistencia adquirida por parte de las células de MM a las quimioterapias, sin embargo, mediante los resultados obtenidos no se pudo evidenciar la importancia del colágeno en este fenómeno (Díaz, 2019). Siguiendo la línea de este proyecto, el presente trabajo se plantea como un diseño de un modelo basado en el cultivo 3D de células de MM en un biorreactor de perfusión, en presencia de microesferas de alginato, en este caso funcionalizadas con Col I y HS, para el estudio del papel que desempeñan ambas biomoléculas en el fenómeno de resistencia CAM-DR.

#### **3.1. HIPÓTESIS**

Un entorno tridimensional consistente en microesferas de alginato en cuya superficie se injertan componentes individuales de la matriz extracelular de la médula ósea mediante la técnica de *Layer-by-layer* (LbL) permitirá el cultivo de células plasmáticas del mieloma múltiple en un biorreactor, así como caracterizar el papel de cada una de las biomoléculas injertadas en la generación de resistencia a fármacos para posteriormente investigar las rutas responsables del efecto de esta resistencia.

### 3.2. MICROGELES DE ALGINATO COMO BIOMATERIAL

Los hidrogeles basados en alginato han sido muy utilizados en la ingeniería tisular debido a que este biomaterial presenta características similares a las de la ECM de los tejidos humanos. Se trata de un polisacárido obtenido a partir de algas marrones y su capacidad para gelificar varía en función de su estructura. Es un copolímero lineal formado por bloques homopoliméricos de residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-glucurónico, unidos covalentemente entre sí (Figura 2) (Reakasame y Boccaccini, 2018).



**Figura 2.** Estructura química del alginato. En la figura está representada una cadena polimérica con dos monómeros de ácido glucurónico (G) y dos monómeros de ácido manurónico (M). (Drury et al., 2004).

Dos bloques de ácido  $\alpha$ -L-glucurónico de polímeros adyacentes pueden entrecruzarse con cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$  mediante los grupos carboxílicos presentes en ambos, formando una red de gel (Figura 3) (Reakasame y Boccaccini, 2018). Se trata de un entrecruzamiento de naturaleza iónica que puede llevarse a cabo de manera sencilla y rápida, facilitando el proceso global de generación del modelo. En la actualidad, la obtención de geles de alginato en forma de microesferas se consigue principalmente mediante gelificación externa en una solución de cationes divalentes (Hernández-González et al., 2020).



**Figura 3.** Esquema del proceso de entrecruzamiento iónico entre los cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  y dos polímeros de alginato a través de los residuos de  $\alpha$ -L-glucurónico. (Figura adaptada a partir de "Chemical Bonds Using Polymers To Understand Chemical Bonds", 2020).

El alginato destaca, además de por dicha capacidad de gelificación, por su baja toxicidad, alta disponibilidad y bajo coste económico. Es un polímero biocompatible y fue declarado como seguro por la FDA (del inglés, *Food Drug Administration*), por lo que ha sido objeto de estudio en muchas aplicaciones biomédicas. Además, las células de mamíferos no poseen receptores

que interaccionen con el alginato, de manera que estos geles son relativamente inertes. (Hernández-González *et al.*, 2020).

Por otra parte, los materiales usados como modelos de la ECM necesitan, normalmente, un módulo elástico específico y reproducible, que pueda ser manipulado de manera controlada. Propiedades mecánicas, como la rigidez, la capacidad de absorción de agua y el grado de hinchamiento, pueden controlarse independientemente en el alginato, mediante factores como la densidad y el tipo de entrecruzador o la concentración de polímero en la solución, siendo esta última proporcional a la rigidez del material (Augst *et al.*, 2006). El aumento de estas variables, sin embargo, conlleva un incremento en la viscosidad de la solución pregelificada y las células que se encuentren en contacto con el polímero pueden dañarse. La temperatura de gelificación también influye en las propiedades mecánicas, consiguiéndose una estructura tridimensional más ordenada cuánto menor es ésta, dado que la velocidad de difusión de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  se reduce y el tiempo de gelificación se prolonga (Drury *et al.*, 2004).

La obtención de los hidrogeles de alginato en forma de microesferas para el cultivo de células permite la expansión del volumen ocupado por el cultivo, dado que el crecimiento celular no está limitado por un armazón rígido, como sería el caso si el cultivo se realizara dentro de los poros de un *scaffold*. Asimismo, el realizar un entrecruzamiento iónico del alginato ofrece la posibilidad de disolver el gel a pH neutro o con la adición de un agente quelante, debido a la pérdida de los cationes divalentes que permiten el proceso (Augst *et al.*, 2006). De esta manera, las células pueden someterse a distintas técnicas de caracterización, como la citometría de flujo, sin que el *scaffold* en el que se lleve a cabo interfiera.

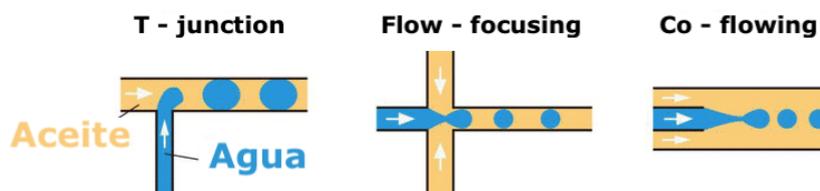
Como alternativa a la disolución del gel de alginato, cabe la posibilidad de incorporar nanopartículas de ferrita en el interior de las microesferas. Esta incorporación no sólo permite separar las microesferas de las células tras el cultivo celular, sino que también facilita el proceso previo de funcionalización con las biomoléculas de interés. En ambos casos, con la ayuda de un imán, las microesferas quedan retenidas junto a la pared de un tubo falcon y el medio líquido puede ser recogido con facilidad.

### **3.3. MICROFLUÍDICA PARA LA OBTENCIÓN DE MICROESFERAS**

La microfluídica es el campo tecnológico que se ocupa del manejo de volúmenes de nanolitros o picolitros en flujo laminar en canales de escala micrométrica, pudiendo aplicarse en distintos ámbitos como la industria alimentaria, química, farmacéutica o biotecnológica. En los últimos años, los sistemas de microfluídica han sido utilizados para la formación de regímenes multifásicos de flujo que, mediante distintas técnicas (*Figura 4*), dan lugar a micropartículas esféricas monodispersas del polímero empleado (Capretto *et al.*, 2008). Polisacáridos como el alginato, la agarosa o el quitosano, representan los polímeros más utilizados en aplicaciones biológicas, de entre los cuales, el alginato destaca por sus fuentes convenientes, su excelente biocompatibilidad, la ausencia de toxicidad y su biodegradabilidad (Liu *et al.*, 2013).

El principio teórico del proceso de obtención de microesferas mediante microfluídica se basa en la dispersión de un líquido en otro inmiscible, generando unidades de fluido independientes. En el sistema de *flow-focusing* la fase dispersa fluye a través del canal central y sufre la fuerza de extrusión de la fase continua a ambos lados, de manera que se estira y rompe, formando gotas individuales, cuya dimensión es menor que la obtenida con otras técnicas. El

tamaño de estas gotas, así como la concentración del polímero en la fase dispersa, determinará el tamaño de las partículas esféricas (Ma *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Representación de las distintas técnicas microfluídicas para la obtención de microesferas de gel. (Figura adaptada a partir de Choe *et al.*, 2018).

La aplicación y funcionalidad de los microgeles depende en gran medida de su forma y tamaño, como ocurre con las células de los organismos vivos, que poseen una forma específica para una función en particular. En general, los microgeles esféricos pueden prepararse a partir de la polimerización por emulsión, de manera que se minimiza la energía libre de la interfase entre las partículas y el medio. En este sentido, materiales hidrofóbicos como el PDMS son utilizados para generar los microcanales y obtener así gotas acuosas, dado que su superficie repele el agua (Figura 5) (Nisisako *et al.*, 2005). En el caso del alginato, pueden obtenerse microesferas de gel de manera que el entrecruzamiento tenga lugar en el interior de los microcanales o en un baño externo. La gelificación externa, sin embargo, permite un mayor control de la morfología dado que parámetros del baño de gelificación que afectan a la tensión superficial y a las propiedades viscoelásticas de las microgotas (como la viscosidad de la solución, el ratio de aceite/agua y la altura de la cual caen las microgotas) pueden modificarse. Asimismo, el tamaño de las microesferas puede controlarse fácilmente, disminuyendo éste conforme aumenta la fuerza de extrusión de la fase continua (Hu *et al.*, 2012).

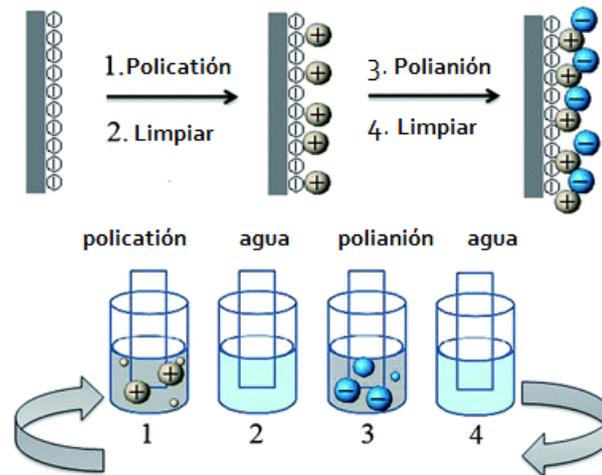


**Figura 5.** Esquema de la influencia de la naturaleza de los canales sobre la morfología de las microesferas.

### 3.4. FUNCIONALIZACIÓN: TÉCNICA DE LAYER-BY-LAYER

Para la funcionalización de las microesferas se eligió la técnica de *Layer-by-layer* (LbL), un proceso cíclico basado en la adsorción secuencial de especies cargadas positiva y negativamente, sumergiendo un sustrato alternativamente en ambas soluciones. Después de cada deposición se enjuaga con un solvente (agua en la mayoría de los casos) para eliminar el exceso de solución y dejar una fina capa cargada (generalmente, del orden de nanómetros), quedando la superficie preparada para la siguiente deposición (Figura 6). La modificación de ciertas propiedades de los materiales (como la densidad de carga) para llevar a cabo el proceso

de manera exitosa, puede conseguirse controlando aspectos como el pH o la temperatura (Kotov NA y Liz-Marzán, 2004; Oliveira *et al.*, 2016).



**Figura 6.** Representación gráfica del proceso de funcionalización de microesferas basado en la técnica de Layer-by-layer. (Figura adaptada a partir de Shariki *et al.*, 2012).

La simplicidad, versatilidad y el control a escala nanométrica que ofrece esta técnica, la convierte en uno de los métodos de recubrimiento más utilizados, para sustratos planos como particulados en ámbitos diversos, entre los cuales se encuentra la biomedicina (Richardson *et al.*, 2015).

En nuestro caso, las microesferas presentan cargas negativas en su superficie debido a que el alginato exhibe, en medio acuoso, grupos ácido carboxílico de las unidades de ácido  $\alpha$ -L-glucurónico (Bonino *et al.*, 2013). En medio ácido, el colágeno queda cargado positivamente por la protonación de los grupos amina presentes en su cadena. El heparán sulfato, por su parte, queda cargado negativamente por los grupos carboxilo del ácido  $\beta$ -D-glucurónico y los grupos sulfato presentes en las unidades de ácido idurónico y en algunas de glucosamina (Khan *et al.*, 2013).

### 3.5. BIORREACTOR DE PERFUSIÓN PARA EL CULTIVO CELULAR

El cáncer, en sus distintas manifestaciones, es una enfermedad compleja y heterogénea y, por dicha razón, mediante el cultivo de las células tumorales en superficies de plástico o cristal no se obtienen conclusiones representativas de lo que ocurre *in vivo*. Además, estas condiciones de cultivo simplificadas limitan la posibilidad de reproducir las señales mecánicas y bioquímicas, así como las interacciones entre células y con la ECM, importantes tanto en la preservación de las células *ex vivo* como en el mantenimiento de señales estromales que les confieren resistencia a quimioterapias. Por ello, ha habido un incremento en el desarrollo de nuevas tecnologías que modelicen la fisiología de tejidos y tumores humanos para la evaluación preclínica de fármacos y para el desarrollo de diagnósticos y tratamientos específicos de paciente.

Sin embargo, más allá de la necesidad de tener un microambiente adecuado que mimetice los componentes y funciones del estroma tumoral, se requieren avances significativos en: (1) la habilidad de trabajar con células primarias humanas y mantenerlas *ex vivo*, (2) diseñar y fabricar sistemas fácilmente manejables para una evaluación de alto rendimiento de la

respuesta celular a fármacos, y (3) incorporar nuevas tecnologías para el *screening* de alto contenido (*high-content screening*) (Zhang *et al.*, 2016).

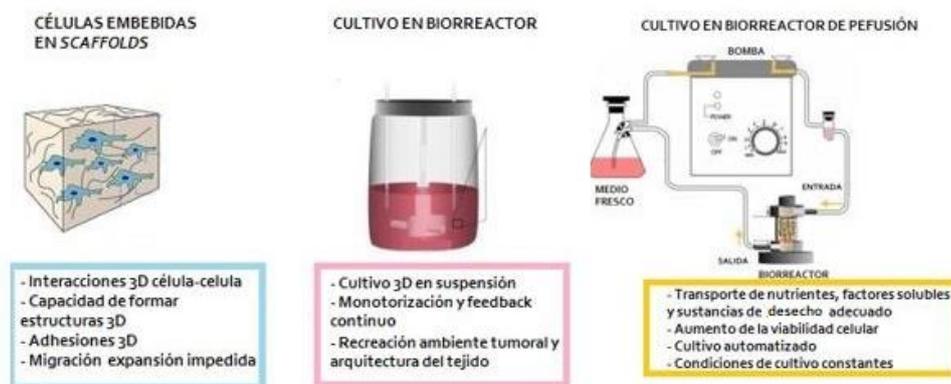
El desarrollo de modelos 3D estáticos (como células embebidas en *scaffolds*, sistemas de cultivo basados en *scaffolds* o esferoides monocelulares o multicelulares) ha permitido mantener la arquitectura de los tejidos; sin embargo, estos modelos presentan ciertas limitaciones a la hora de replicar el ambiente biomecánico o las condiciones de transferencia de masa que encontramos en el tumor *in vivo*. Por ello, se propone el cultivo en biorreactor de perfusión para el modelo de MM planteado, de modo que ciertos aspectos variables del ambiente puedan estar automatizados.

Este sistema, por tanto, permitirá una organización espacial adecuada de las células y biomateriales en pocillos; será capaz de mantener las células cultivadas durante largos periodos de tiempo (varias semanas), lo cual puede ser necesario a la hora de determinar la respuesta a largo plazo de las células a fármacos; y será compatible con técnicas de caracterización, como la determinación del fenotipo y el genotipo.

### 3.5.1. El efecto del fenómeno de perfusión

Se ha demostrado que en los cultivos en biorreactores de flujo libre o con agitación orbital, el transporte de nutrientes hacia el centro del tejido no es adecuado, como ocurre bajo condiciones estáticas, de modo que la viabilidad celular en estas regiones se ve afectada. Por tanto, un sistema que permita un flujo a través de la totalidad del volumen ocupado por las células es necesario para superar estas limitaciones de difusión (Figura 7) (Jaasma *et al.*, 2007).

En la ECM del tejido *in vivo*, se mantiene un microambiente quimioestático estable a través del flujo intersticial, haciendo llegar nutrientes y moléculas de señalización y retirando los desechos metabólicos. Sin embargo, los cultivos convencionales 2D y 3D estáticos, se basan en el suplemento de medio y retirada de los productos del metabolismo por tandas, provocando un estrés oxidativo y una pérdida de la función y la viabilidad celular a corto plazo. Además, los cambios de medio intermitentes pueden dar lugar a fluctuaciones en las condiciones de cultivo. Los cultivos de perfusión, sin embargo, pueden mimetizar el fluido intersticial y las fuerzas de cizalla a las que las células están expuestas *in vivo* y que afecta a los fenómenos de migración y metástasis en células tumorales. Asimismo, permite un mayor control de la heterogeneidad del ambiente en el *scaffold*, donde el crecimiento celular y la concentración de factores solubles no es uniforme (Lui y Cui, 2013).



**Figura 7.** Comparación de los sistemas de cultivo hidrodinámicos y las posibilidades de estudio que ofrece cada uno. (Figura adaptada a partir de Fridley *et al.*, 2012).

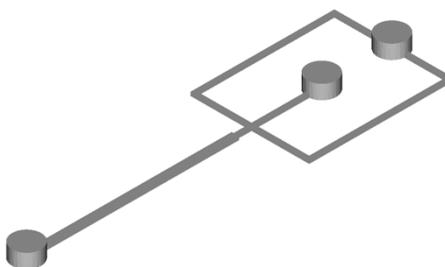
## 4. PROTOCOLOS DE FABRICACIÓN

### 4.1. SISTEMA DE MICROFLUÍDICA: DISEÑO Y DESCRIPCIÓN

El tamaño de las microesferas obtenidas en un circuito de microfluídica depende de varios factores: por una parte, los caudales volumétricos del medio continuo y del líquido a dispersar, propiedades físicas de los dos fluidos que intervienen (como sus viscosidades y densidades) y la tensión superficial; por otra parte, el tamaño del canal, que es clave para mantener el flujo laminar, también influye en el tamaño mínimo de microgota formado. En este trabajo hemos explorado el uso de dos circuitos de microfluídica con dos tamaños de canal diferentes: uno de 500  $\mu\text{m}$  de ancho y otro de 50  $\mu\text{m}$ . En ambos casos el circuito se forma a partir de una plantilla, un negativo, del canal que producimos por impresión 3D y que hará de molde para la polimerización de la silicona (PDMS) con la que se produce el circuito.

#### 4.1.1. Impresión por deposición de material fundido (FDM)

Para generar el sistema de microfluídica con un tamaño de canal de 500  $\mu\text{m}$ , el primer paso fue diseñar una plantilla de los canales que lo conforman haciendo uso del software de modelación digital FreeCAD (*Figura 8*). La plantilla fue después impresa sobre un cristal tratado con espray adherente mediante la impresora Prusa I3MK3, que deposita un filamento de ácido poliláctico (PLA Tech de FFFWorld). Tras la impresión, el cristal se limpió abundantemente con agua Ultra Pura (UP) con el fin de remover el espray de la superficie y se dejó secar durante 24h. Para el circuito, se utilizó PDMS (Sigma-Aldrich, C481939) vertiendo el precursor de PDMS sobre el cristal para su polimerización. Se eligió el PDMS por ser un material inerte para los fluidos utilizados y permitir el seguimiento del proceso por su transparencia.



**Figura 8.** *Diseño de la plantilla de los canales del circuito de microfluídica para su impresión tridimensional por FDM.*

En primer lugar, se pesa el PDMS en un recipiente cuya superficie sea lo suficientemente grande para que el PDMS forme una fina capa y se facilite así la salida de aire en el posterior proceso de desgasificación a vacío. Asimismo, se añade el agente de curado de PDMS (Sigma-Aldrich) en relación 1:10 de masa. Para eliminar las burbujas ocasionadas por el proceso de mezcla, se somete a vacío durante 15 min y, una vez eliminadas, se vierte tanto en el molde de resina como en una superficie de cristal, siendo este último el PDMS que funcionará como base de nuestro sistema. A continuación, se cura todo el PDMS introduciendo el conjunto en la estufa a 45°C durante 24h.

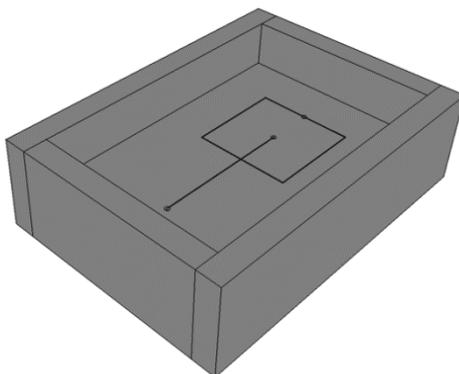
Tras este tiempo, con cuidado y con ayuda de 70% EtOH, se separa el PDMS del cristal, limpiando especialmente la cara en contacto con el molde, en el cual se encuentran grabados

los canales del circuito. Con una aguja afilada en el extremo y acoplada a una jeringuilla, se agujerean los canales de entrada y salida al circuito mediante un solo movimiento vertical y se verifica que no hay PDMS residual obstruyéndolos. Asimismo, separamos el PDMS que funcionará como base del cristal y limpiamos ambos con 70% EtOH.

Una vez secas, ambas piezas de PDMS se someten a un tratamiento de plasma (PLASMA ELECTRONIC PICCOLO GHz) durante 90s en condiciones de un 100% de atmósfera de oxígeno y 15s de homogenización a 120W de potencia. Inmediatamente después, ambas se ponen en contacto (quedando la cara en la que se encuentran los canales en el interior) y se dejan curar en una estufa precalentada a 85°C durante 24h.

#### 4.1.2. Impresión por procesamiento digital de la luz (DLP)

Para los circuitos con canales más estrechos, el primer paso fue el diseño una pieza a modo de negativo mediante el programa FreeCAD (*Figura 9*). Se obtuvo mediante impresión 3D haciendo uso de una impresora de resina curable con LCD-UV (Anycubic Photon S), empleando la resina fotopolimérica Monocure Rapid Clear. Para el curado de la pieza y la eliminación de la resina restante, ésta se limpió en un recipiente con 70% EtOH durante 10 min y, posteriormente, se expuso a luz ultravioleta durante 1h. A continuación, el molde se mantuvo en agua UP durante 2h y se colocó en una estufa a 45°C durante 24h. Por último, se colocó en agua UP durante 30 min, tras lo cual quedó libre del activador en su totalidad, evitándose así que éste inhiba la polimerización del PDMS al introducirlo en el molde.



**Figura 9.** *Diseño del molde del circuito de microfluídica para su impresión tridimensional por DLP.*

Para el circuito se utilizó de nuevo PDMS, vertiendo el precursor de PDMS en el molde de resina y permitiendo su polimerización en el interior. El protocolo de generación es idéntico al previamente explicado, con la particularidad de que, en esta ocasión, cuando ambas piezas de PDMS se ponen en contacto y se dejan curar en la estufa a 85°C durante 24h, es necesario colocar placas de cristal arriba y abajo del sistema y un peso de 1kg sobre la placa superior. Este último paso es necesario para aumentar el área de contacto entre las dos superficies, debido a que la resina del molde deja sobre la base del PDMS una microtextura que dificulta la unión tras el tratamiento con plasma.

## 4.2. PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO

En este proceso se utiliza el circuito de microfluídica para formar las microgotas de la solución de alginato, pero la coagulación no tiene lugar dentro de circuito, sino en un paso posterior. Este consiste en dejar gotear el medio continuo que contiene las microgotas en un baño de una disolución acuosa de cloruro cálcico.

### 4.2.1. Materiales

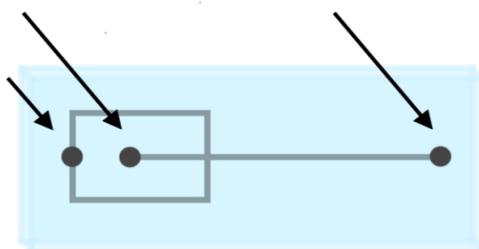
La fase dispersa que se empleó fue una solución de alginato sódico (Alg) (Sigma-Aldrich, C180827), preparada a una concentración del 1% p/v en agua UP. Para su homogenización, se mantuvo a 100°C en agitación mecánica durante 30 min.

Para la fase continua se utilizó aceite de girasol a modo de líquido inmiscible que permitiera la formación de microgotas de alginato sódico. Además, para estabilizar la emulsión y facilitar la llegada de las microgotas al baño de calcio sin que se agrupen, se añade al aceite SPAN 80 (Sigma-Aldrich, 1338-43-8) a una concentración del 0,3% v/v a modo de surfactante.

### 4.2.2. Obtención de las microesferas de alginato

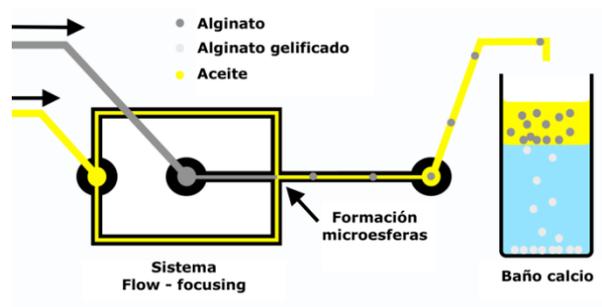
En primer lugar, se prepara 20mL de una solución de alginato sódico a una concentración del 1% p/v en agua UP y se deja en agitación mecánica a 100°C durante 30 min. Mientras dicha solución se homogeniza, preparamos 200mL de solución de cloruro cálcico anhídrido puro (Scharlab S.L.) a una concentración del 20% p/v en un vaso de precipitados de 250mL. Se mantiene en agitación mecánica constante durante 10 minutos y sin aporte de calor, dado que se trata de una reacción exotérmica. Asimismo, se añade un 0,3% v/v de SPAN 80 al aceite. En el caso de querer incorporar nanopartículas de ferrita de hierro para facilitar la manipulación posterior de las microesferas, éstas se incorporarían en la solución de alginato, dispersándolas mediante ultrasonidos.

A continuación, se preparan dos bombas de inyección (Harvard Apparatus PHD/ ULTRA), ajustando los parámetros para jeringas de 6 y 20mL que serán utilizadas para el alginato y el aceite, respectivamente, y para los flujos que se deseen en ambas fases. Asimismo, se cargan ambas jeringas con los respectivos fluidos, asegurándonos de que no haya burbujas en su interior que puedan afectar al mantenimiento de las condiciones deseadas. Seguidamente, se ensambla el sistema de microfluídica, conectando dos tubos de entrada procedentes de cada una de las jeringas y un tubo de salida, por el que obtendremos las microgotas de alginato. El tubo que pertenece a la fase continua se conecta a los canales externos y el correspondiente a la fase dispersa se conecta al canal central (*Figura 10*).



**Figura 10.** Representación del sistema de microfluídica con indicaciones para conectar los tubos de entrada correspondientes al medio continuo y disperso y el tubo de salida.

Se encienden ambas bombas, siendo la primera en ponerse en funcionamiento la que contiene la jeringa de aceite, minimizando así el riesgo de obstrucción por la adhesión del alginato a las paredes del sistema. Una vez estabilizados los flujos, tras 1 minuto en funcionamiento aproximadamente, observamos la formación constante de microgotas en los canales del sistema y podemos proceder a la reticulación de éstas. Para ello, colocamos el tubo de salida próximo a la solución de cloruro cálcico, sin llegar a introducirlo en dicha solución (a una gota de distancia, aproximadamente) (*Figura 11*). Para evitar que las microgotas se agrupen antes de llegar a la interfaz de aceite y cloruro cálcico, es conveniente rotar manualmente el conducto de salida, de modo que las gotas no caigan sobre lugares en los que el alginato aún no se encuentre reticulado.



**Figura 11.** Diagrama de la formación de microgotas de alginato en el sistema de microfluídica y su reticulación posterior en un baño de cloruro cálcico para la obtención de microesferas.

Para garantizar su correcta gelificación, se mantienen en el baño externo de calcio durante 20 minutos. Tras este tiempo, las microesferas gelificadas se encuentran precipitadas. Para eliminar por completo el contenido en aceite, se hacen pasar las microesferas por un tamiz pluriStrainer® con un tamaño de poro de 40µm y con ayuda de una jeringa. El aceite que queda en la superficie del tamiz se retira con etanol y, posteriormente, se guardan las microesferas en 70% EtOH a temperatura ambiente.

#### 4.2.3. Mantenimiento del sistema de microfluídica

Después de cada utilización, el sistema fue lavado haciendo uso de las jeringas. En primer lugar, con agua UP para eliminar los restos de alginato y evitar que, con el posterior lavado con 70% EtOH, éste precipite en el interior del sistema. En aquellos casos en que se obstruyó el sistema como consecuencia del alginato precipitado, éste fue rellenado con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5M (Sigma-Aldrich, 20-158), quelante de calcio que elimina los entrecruzamientos y solubiliza el alginato, quedando así los canales totalmente limpios.

#### **4.2.4. Caracterización y control de calidad**

##### **4.2.4.1. Morfología y tamaño de las microesferas**

Por un lado, para caracterizar la morfología de las microesferas obtenidas, se utiliza en primer lugar el microscopio estereoscópico SMZ-140 de MOTIC, de modo que se toman imágenes de éstas y se mide su diámetro para una posterior representación gráfica de los datos en forma de histogramas. Este proceso permite comprobar la homogeneidad de los tamaños de las partículas.

Asimismo, mediante el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat Politècnica de València (UPV), se analiza la superficie de las microesferas gracias a su alta resolución, además de comprobar de una manera más precisa su tamaño y morfología. Las muestras analizadas por FESEM, sin embargo, deben ser secadas antes de introducirlas en el microscopio y para salvaguardar la estructura de las microesferas, el método empleado es el de secado por punto crítico. El primer paso es fijar la muestra con glutaraldehído al 3% v/v en agua UP durante 30 min y, posteriormente, lavar con tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate-buffered saline* – PBS) para eliminar los restos. A continuación, se sumergen las microesferas durante 10 min en soluciones del 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100% de etanol en agua UP para deshidratarlas sin modificar su estructura, de modo que el agua queda sustituida por etanol. Por último, se extrae el disolvente en un secador por punto crítico y se examina la muestra inmediatamente después, para evitar la rehidratación de ésta.

##### **4.2.4.2. Evaluación de la estabilidad de las microesferas**

Por otro lado, con el fin de confirmar que la estabilidad de las microesferas es suficiente como para soportar las condiciones de cultivo de los futuros ensayos de resistencia a fármacos, éstas se sumergen en medio de cultivo durante 3 días (tiempo empleado en dichos ensayos). Pasado este tiempo, vuelven a caracterizarse morfológicamente, comprobando que no existen cambios significativos en su integridad.

### **4.3. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS**

#### **4.3.1. *Layer-by-layer* para exhibir en la superficie cadenas de colágeno tipo I**

Para exhibir en la superficie de las microesferas las cadenas de colágeno tipo I, se propone realizar la técnica de LbL utilizando como biomoléculas el colágeno tipo I y el alginato. Las concentraciones para cada biomolécula y los tiempos del proceso están basados en los protocolos de Ye *et al.* en 2012 y Zhao *et al.* en 2013, en los que se emplea LbL con dichas biomoléculas para un fin similar.

En primer lugar, se prepara una solución de HEPES (Sigma-Aldrich, C83264) a pH 7.0 y agua UP a pH 5.0. A continuación, se preparan las disoluciones a 1mg/mL de Alg y Col I (Sigma-Aldrich, C3867), éste último a partir de una concentración inicial de 4mg/mL. En ambos casos, diluyéndolas con agua UP a pH 5.0 para aportar carga negativa y positiva, respectivamente, y equilibrándolas con HEPES.

El proceso se inicia sumergiendo las microesferas en agua UP a pH 5.0 durante 15 min, en agitación a 600 rpm, para cargarlas negativamente. Transcurrido este tiempo, se sumergen en la disolución de Col I durante 20 min en las mismas condiciones de agitación. Las microesferas se retiran de la solución, bien empleando un tamiz de 70  $\mu\text{m}$  o bien reteniéndolas con la ayuda de un imán en el interior del tubo falcon en el caso de que lleven nanopartículas de ferrita de hierro incorporadas en su interior. Posteriormente, se lavan con agua a pH 5.0 y se introducen en la disolución de Alg, también durante 20 min y en las mismas condiciones de agitación.

Los pasos se repiten sucesivamente de modo que, al finalizar el proceso, se han depositado 6 capas de Col I y 4 de Alg, quedando de esta manera expuestas las cadenas de colágeno en la superficie.

#### **4.3.2. Layer-by-layer para exhibir en la superficie cadenas de heparán sulfato**

Para la funcionalización con heparán sulfato, se propone realizar la técnica de LbL haciendo uso de heparán sulfato (HS) como polianión y poli(L-lisina) (PLL) como policación. El presente protocolo está basado en el llevado a cabo por Zahr en 2007.

Primeramente, se prepara una solución de HEPES a pH 7.4 y agua UP a pH 5.0. Asimismo, se preparan las disoluciones de HS y PLL a 2mg/mL, diluyendo ambas en PBS. La disolución de HS se prepara en PBS a pH 7.4, de manera que queda cargada negativamente. La disolución de PLL, por su parte, se ajusta a pH 4.0 para aportar la carga positiva.

El proceso se inicia introduciendo las microesferas durante 15 min en agua UP a pH 5.0 en agitación a 600 rpm para cargarlas negativamente. A continuación, se sumergen en la disolución de PLL durante 30 min en las mismas condiciones de agitación. Las microesferas se retiran de la solución, bien empleando un tamiz de 70  $\mu\text{m}$  o bien reteniéndolas con la ayuda de un imán en el interior del tubo falcon en el caso de que lleven nanopartículas de ferrita de hierro incorporadas en su interior. Posteriormente, se lavan con HEPES a pH 7.4 y se sumergen en la disolución de HS durante 30 min en las mismas condiciones de agitación. Por último, vuelven a separarse y se lavan con HEPES a pH 7.4.

Los pasos correspondientes a la deposición de capas alternativamente se repiten hasta haber depositado 5 capas de PLL y 5 capas de HS, siendo la última capa de HS para exhibir sus cadenas en la superficie.

#### **4.3.3. Caracterización y control de calidad**

##### **4.3.3.1. Análisis cualitativo de colágeno y heparán sulfato: FTIR**

La técnica FTIR (espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier) es un método de espectroscopía basado en la capacidad de una muestra de absorber y transmitir radiación de infrarrojos en función de la estructura química de las moléculas que la compongan. El proceso se lleva a cabo haciendo uso del equipo BRUKER ALPHA PLATINUM ATR, y la señal obtenida resulta en un espectro (*software* de adquisición OPUS) que permite confirmar la presencia de las biomoléculas en la superficie de las microesferas tras el protocolo de funcionalización. Estos espectros son convertidos a formato .txt, de manera que pueden ser

leídos por el *software* Excel y generar gráficos en los que se observen los picos de absorbancia característicos del colágeno y el heparán sulfato, en función de la biomolécula que se exhiba en la superficie de las microesferas. Asimismo, se grafican los espectros obtenidos de microesferas sin funcionalizar a modo de control negativo.

#### **4.3.3.2. Análisis cuantitativo de colágeno: BCA**

El ensayo de ácido bicinconínico (BCA) es un método de detección colorimétrica y cuantificación de proteína total en una muestra, basado en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de proteínas en medio alcalino y su detección tras la formación del complejo BCA- $\text{Cu}^+$ . Dicha reacción se detecta por espectrofotometría a 562 nm y la absorbancia se incrementa linealmente conforme aumenta la cantidad de proteína. Se trata de un método altamente sensible para muestras diluidas y es válido para un amplio rango de concentraciones.

La evaluación se realiza para cada capa de colágeno depositada, de manera que se detecta su presencia a la vez que se comprueba un incremento en la cantidad de proteína a medida que avanza el proceso, empleando microesferas sin funcionalizar como control.

#### **4.3.3.3. Análisis cuantitativo de heparán sulfato: Azul de toluidina**

El azul de toluidina es un colorante catiónico de color azul cuyas moléculas, al exponerse a estructuras ricas en grupos aniónicos como el heparán sulfato, se agrupan y alteran la longitud de onda absorbida, de manera que se torna de color rojo-púrpura. La longitud de onda para la cual se registra una absorbancia mayor es a 631 nm, sin embargo, en presencia de HS, este máximo de absorbancia disminuye. Su detección, por tanto, puede llevarse a cabo por espectrofotometría a 631 nm siguiendo el protocolo descrito por Smith y colaboradores. La absorbancia disminuirá linealmente en la solución conforme aumente la cantidad de HS en la superficie de las microesferas, la cual podrá ser cuantificada a partir de una curva de calibración realizada con soluciones de concentración conocida de HS (Smith *et al.*, 1980).

#### **4.3.3.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) se basa en la medida de la fuerza de interacción entre una punta, de apenas unas pocas moléculas, y la superficie del material que se quiere ensayar y que se desplaza bajo la punta en el plano x-y mediante un piezoeléctrico con precisión nanométrica. En nuestro caso, el barrido en x-y se fijará en un cuadro de 500x500 nm, una superficie muy pequeña comparada con el diámetro de la microesfera, de modo que la forma esférica de las partículas no supone un inconveniente en la aplicación de esta técnica.

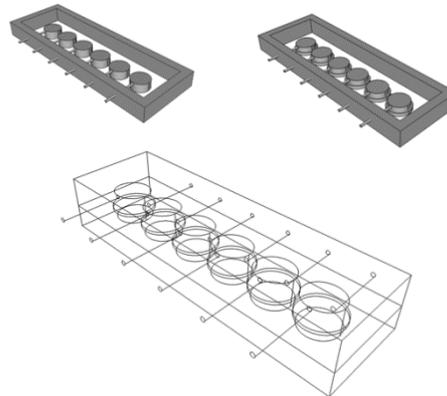
Si el equipo se programa de modo que el material se acerque o se separe de la punta desplazándolo en el eje z, para que la fuerza de interacción se mantenga constante, se obtiene un mapa de la altura z en función de la posición x-y, y con ello un mapa de la topografía de la superficie. La acumulación de capas depositadas tras la técnica de LbL se espera produzca un cambio en la rugosidad superficial, de manera que pueda caracterizarse la presencia del recubrimiento. Por otro lado, haciendo vibrar la punta sobre la superficie, se obtiene un mapa del desfase de onda en función de la interacción de ambas. La presencia del recubrimiento cambiará el comportamiento viscoelástico de la superficie y, por tanto, podrá detectarse mediante el mapa de ángulo de fase. Por último, si la punta penetra unos nanómetros en la superficie entre puntos separados nanométricamente entre sí, se puede obtener un mapa de la rigidez de la superficie, que también se espera dependiente de la distribución superficial del recubrimiento.

## 4.4. BIORREACTOR DE PERFUSIÓN

### 4.4.1. Diseño y fabricación

Para el desarrollo y curación del biorreactor, de nuevo, se genera un molde de resina mediante impresión 3D (DLP) (*Figura 12*) y se rellena con PDMS, siguiéndose en todo momento el protocolo explicado anteriormente para la fabricación del circuito de microfluídica. No obstante, antes de añadir el precursor del polímero al molde, se introducen dos agujas en cada microcamara de cultivo para dar forma a los canales de entrada y salida de cada una, las cuales son retiradas tras el proceso de curado en la estufa durante 24h.

Previamente a la unión de las dos piezas curadas que componen el biorreactor, se ensambla la membrana a la hendidura presente en la parte central de cada una de las cámaras de cultivo con PDMS en estado líquido y se introduce en la estufa a 150°C para garantizar su adhesión. Ambas piezas son tratadas con plasma para su unión del modo anteriormente mencionado.



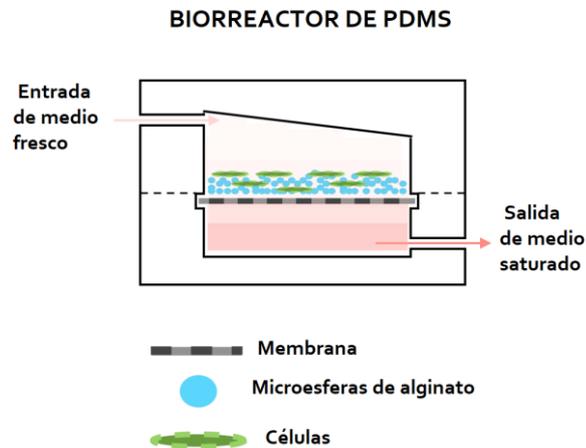
**Figura 12.** *Diseño del molde del biorreactor para su impresión tridimensional por DLP.*

El biorreactor presenta una serie de ventajas que permiten simplificar la manipulación y mejorar el control de las condiciones del cultivo celular en comparación con otros diseños (*Figura 13*).

En primer lugar, la entrada y salida del medio de cultivo tiene lugar a través de canales distintos, de manera que se distingue entre medio fresco y saturado. Esta incorporación y retirada del medio se lleva a cabo mediante una bomba peristáltica, la cual permite a su vez la posibilidad de reciclar o renovar parcialmente el medio de cultivo, evitándose así la pérdida de factores de crecimiento solubles. Este fenómeno de perfusión no sólo garantiza una correcta eliminación de las sustancias de desecho, al contrario de lo que ocurre en los sistemas regidos por difusión simple, sino que permite controlar el flujo de medio. Asimismo, el hecho de que el biomaterial esté presente en forma de microesferas contribuye a que el flujo sea uniforme en todo el biorreactor y se elimine, por tanto, la totalidad de los restos.

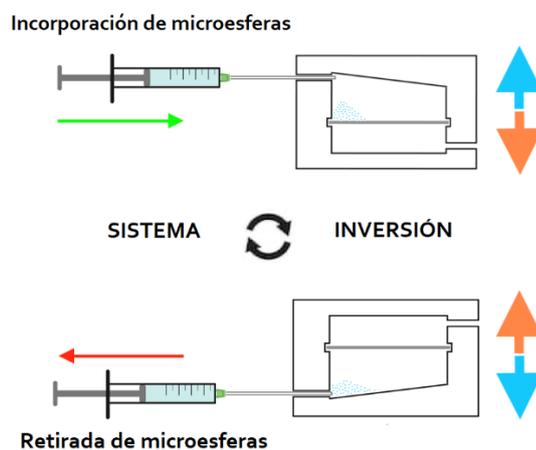
En la parte central de la cámara de cultivo, se encuentra presente una membrana de PET (tereftalato de polietileno – *polyethylenterephthalat* en inglés) retirada de un sistema de separación pluriStrainer® de pluriSelect, con un tamaño de poro de 1µm que evita el arrastre de

las células y microesferas cultivadas a través del canal de medio saturado. La naturaleza inerte de este material evita una posible reacción con cualquiera de los componentes del medio y su propiedad antiadherente garantiza el mantenimiento del cultivo en suspensión y reduce la probabilidad de obstrucción del filtro.



**Figura 13.** *Diseño del biorreactor de perfusión para el cultivo de células de MM en presencia de microesferas de alginato funcionalizadas.*

Gracias a la pendiente que presenta la parte superior de la cámara de cultivo, la retirada de microesferas y células puede realizarse de manera sencilla, simplemente invirtiendo la posición del biorreactor y extrayéndolas con una jeringa o una pipeta (*Figura 14*). Este movimiento permite obtener ambos componentes depositados próximos al orificio, evitando pérdidas durante el proceso. Por otro lado, el diseño permite el mantenimiento de las condiciones de asepsia, debido a que la cámara de cultivo se encuentra cerrada a excepción de los canales de entrada y salida.



**Figura 14.** *Representación de los procesos de la manipulación de microesferas para el cultivo en el biorreactor de perfusión.*

#### 4.4.2. Esterilización del biorreactor

La esterilización del biorreactor previamente a ser utilizado para el cultivo celular se realiza por irradiación con rayos gamma. Para ello, los biorreactores son envasados al vacío en sobres de esterilización (Vapeur Steam Dampf, ISO 11607-1&) empleando la selladora de vacío Sammic V201 y, posteriormente, son enviados a la empresa Aragamma S.L de Barcelona, donde se lleva a cabo el proceso.

#### 4.4.3. Cultivo celular

El biorreactor está pensado para el crecimiento de líneas celulares de mieloma múltiple durante periodos lo suficientemente prolongados como para observar el efecto de los fármacos quimioterapéuticos en la viabilidad y supervivencia celular a largo plazo.

En estudios anteriores, se cultivó la línea celular RPMI 8226 en medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher), suplementado con 15% suero fetal bovino (FBS), 1% L-glutamina y 1% penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL). Se observó una saturación del medio de cultivo a 7 días para un número inicial de células de  $1,5 \cdot 10^5$  cultivadas en un volumen de 500  $\mu$ L, siendo la relación de microesferas/medio líquido de 20:80 y estando la dinámica del cultivo regida por agitación orbital (Marín-Payá *et al.*, pendiente de publicación). No obstante, las líneas celulares de MM son heterogéneas en base a su fenotipo, anomalías cromosómicas y respuestas a factores de crecimiento, de modo que trabajar con una de ellas exclusivamente no reflejaría la diversidad de la enfermedad. La línea mencionada pertenece a las líneas celulares de MM no dependientes de IL-6, identificada como el principal factor de crecimiento para las células del mieloma múltiple; por ello, se contempla trabajar con al menos una línea celular adicional que responda a esta interleucina, como es la línea XG-1 (condiciones de cultivo según Corre *et al.*, 2007).

El cultivo de los distintos componentes en las proporciones del estudio mencionado, a priori, garantiza una movilidad y expansión celular adecuada a través del *scaffold*, así como una distancia entre células (y entre éstas y las biomoléculas presentes en la superficie de las microesferas) comparable con la proximidad *in vivo*. Asimismo, el hecho de que el volumen de medio líquido predomine sobre el volumen de microesferas contribuye al cultivo en suspensión característico de estas células (con la ayuda, no obstante, de agitación orbital). El problema de la saturación a los 7 días de cultivo, por su parte, pretende solucionarse con la retirada parcial de células a medida que el fenómeno ocurra, incorporando la parte proporcional de microesferas que hayan sido retiradas conjuntamente.

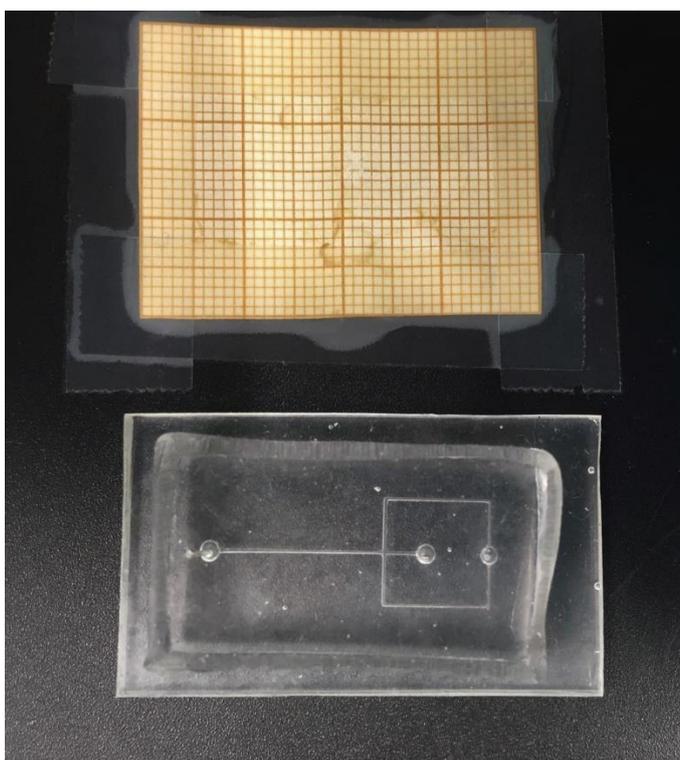
Las condiciones de cultivo serán mantenidas con la ayuda de un incubador, en el que se encontrarán tanto el biorreactor como el envase de medio de cultivo, conectados ambos a la bomba peristáltica, colocada en el exterior. El flujo de medio de medio fresco será de 200  $\mu$ L/día, de modo que se automatiza lo que Marín-Payá y colaboradores realizaban manualmente, y los fármacos objeto de estudio se incorporarán mediante la bomba peristáltica, adicionándolos al medio de cultivo en la dosis correspondiente para cada uno de ellos. Para probar la utilidad del biorreactor, se propone realizar los ensayos con bortezomid y dexametasona llevados a cabo en el estudio de Marín-Paya y colaboradores.

## 5. PRUEBAS DE CONCEPTO

### 5.1. CIRCUITOS DE MICROFLUÍDICA

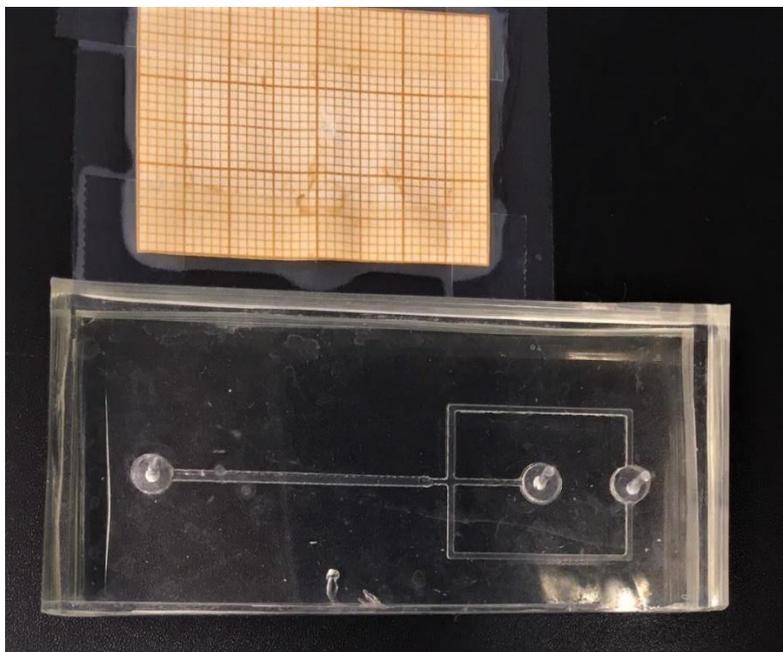
Durante el tiempo en el que el trabajo pudo llevarse a cabo experimentalmente, se generaron ambos dispositivos microfluídicos de PDMS.

El dispositivo obtenido a partir del molde de resina de impresión por DLP (*Figura 15*) se pensó inicialmente como sustituto del generado a partir de la plantilla de termopolímero por FDM, dado que la primera de las técnicas permite obtener una resolución mayor de los canales impresos. De esta manera, puede ser utilizada para diseñar canales de dimensiones menores y producir microesferas de alginato de tamaño celular, lo cual permite aumentar el área superficial total de microesferas en el medio de cultivo y, con ello, la presencia de las biomoléculas injertadas en ellas. Sin embargo, la microtextura ocasionada por la resina de impresión en el PDMS, dificulta la adhesión del circuito a la base y la unión es más débil. Este fenómeno conlleva la imposibilidad por parte del sistema de soportar flujos altos, suponiendo un descenso del rendimiento en la producción de microesferas.



**Figura 15.** Dispositivo PDMS con un circuito de dimensiones de 10 x 20 mm y con una anchura de canal de 50 $\mu$ m.

Por ello y puesto que se considera que la diferencia de tamaño de las microesferas no afecta de manera significativa a la hora de estudiar el papel del Col I y el HS en la resistencia adquirida a las quimioterapias, se pasó a producir los microgeles mediante el sistema de mayor tamaño (*Figura 16*).

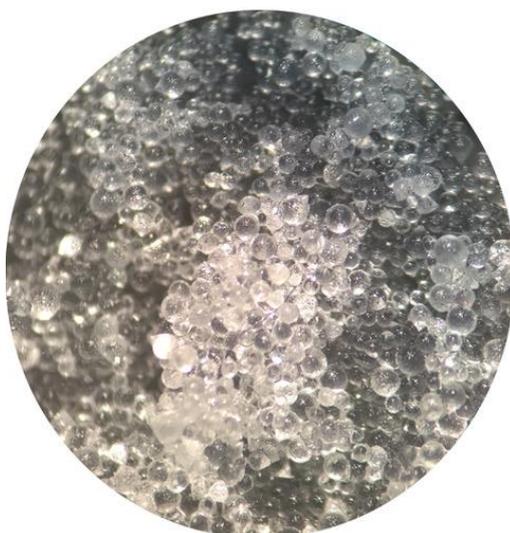


**Figura 16.** *Dispositivo PDMS con un circuito de dimensiones de 16,5 x 50 mm y con una anchura de canal de 500  $\mu\text{m}$ .*

## 5.2. MICROESFERAS DE ALGINATO

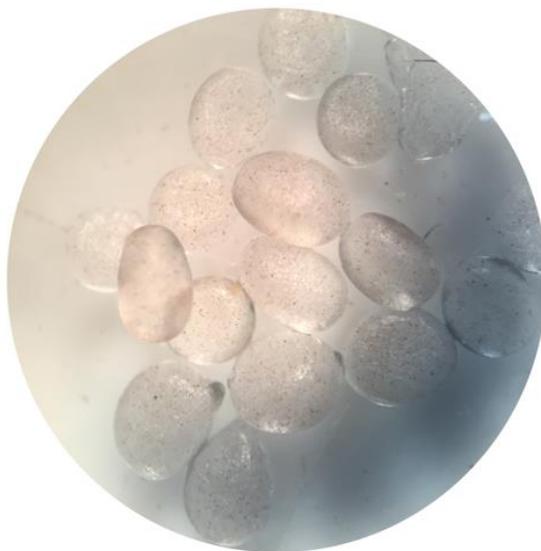
Las microesferas de alginato se obtuvieron según el protocolo explicado en el apartado 4.2.2. Las microesferas de menor tamaño se consiguieron para flujos de 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  para la fase dispersa de alginato y de 1500  $\mu\text{L}/\text{min}$  para la fase continua de aceite, siendo éstos lo suficientemente altos como para que el rendimiento en la producción de microesferas sea el deseado, pero existiendo entre ellos una diferencia significativa que permita la obtención de microesferas de pequeñas dimensiones.

La caracterización de éstas no pudo realizarse en su totalidad, razón por la cual las dimensiones no se conocen con exactitud. No obstante, durante su separación del baño de cloruro cálcico, fueron doblemente tamizadas. Se utilizó un tamiz de 250  $\mu\text{m}$  y uno de 70  $\mu\text{m}$ , quedando todas ellas retenidas en este último. Tal y como se observa en la *Figura 17*, los tamaños de las distintas microesferas varían significativamente, y se estima que estén comprendidos entre 150 y 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17.** Imagen obtenida mediante el microscopio estereoscópico SMZ-140 de MOTIC de microesferas de alginato generadas por un sistema de microfluídica de flow-focusing de tamaño estimado comprendido entre 150 y 250  $\mu\text{m}$ .

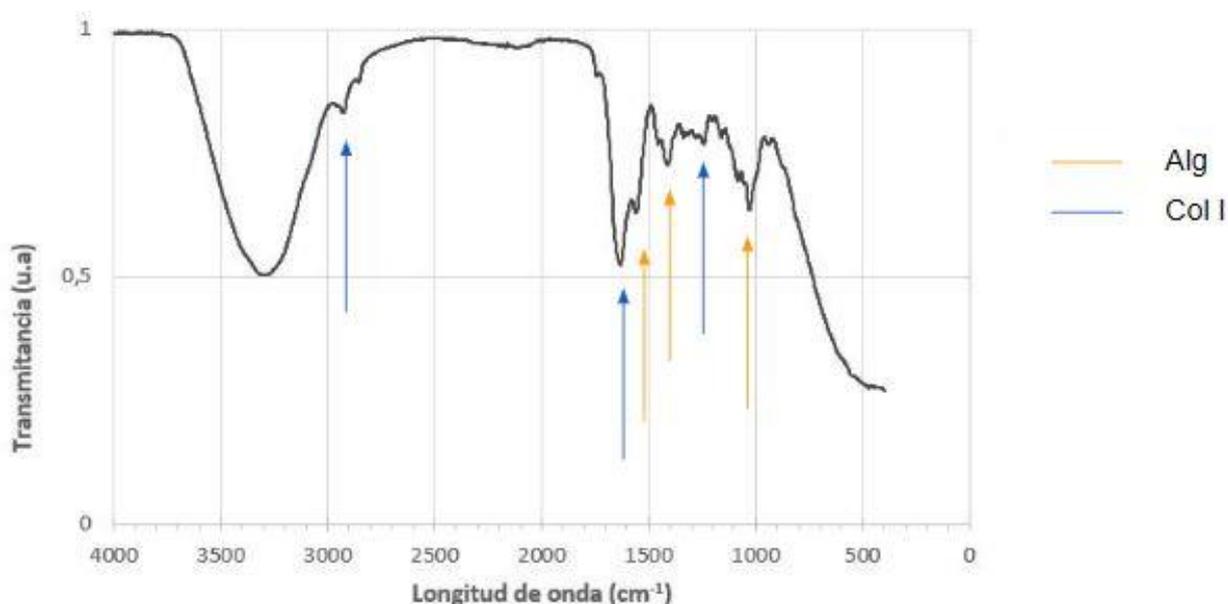
Asimismo, se obtuvieron microesferas de alginato con ferrita de hierro en su interior como puede observarse en la *Figura 18*, de modo que se facilitara la posterior manipulación en procesos como la funcionalización con ambas biomoléculas (durante los cambios de disolución para depositar las distintas capas) o la caracterización celular (de manera que, en lugar de disolver el gel, las microesferas pueden separarse totalmente de las células evitando la presencia de alginato en los distintos procedimientos). El protocolo de separación de las microesferas del baño externo de cloruro cálcico fue idéntico al utilizado para las que no contienen ferrita, por lo que se estima un tamaño comprendido también entre 150 y 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Imagen obtenida mediante el microscopio estereoscópico SMZ-140 de MOTIC de microesferas de alginato con ferrita de hierro en su interior, generadas por un sistema de microfluídica de flow-focusing de tamaño comprendido entre 150 y 250  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS

El proceso de funcionalización mediante la técnica de *Layer-by-layer* sólo pudo llevarse a cabo para la exhibición de las cadenas de colágeno en la superficie de las microesferas. El gráfico resultante del FTIR (*Figura 19*) muestra los picos característicos de alginato en el intervalo 1200-870  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a la región de carbohidratos, con un pico principal cerca de 1029  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, se observa un pico correspondiente a la franja de tensión asimétrica del grupo  $\text{COO}^-$  cerca de 1590  $\text{cm}^{-1}$  y una cercana a 1410  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la franja de tensión simétrica del grupo  $\text{COO}^-$  (Van Hoogmoed *et al.*, 2003). En cuanto al colágeno, se observan las bandas que se corresponden con la amida I en 1630  $\text{cm}^{-1}$  (tensión C=O) y con la amida III en 1232  $\text{cm}^{-1}$  (tensión C-N y deformación N-H). Por último, encontramos el pico característico de tensión C-H entre 2900 y 3000  $\text{cm}^{-1}$  (Susi *et al.*, 1971).



**Figura 19.** Representación gráfica del espectro obtenido mediante FTIR de las microesferas funcionalizadas con Col I. Las flechas señalan los picos característicos de Col I y Alg.

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que pueden extraerse tras el estudio realizado son:

- Ambos circuitos de microfluídica *flow-focusing* permiten obtener microesferas de alginato con un alto grado de monodispersidad, de una manera simple y reproducible.
- La posibilidad de regular el tamaño de las microesferas en función de los canales y las condiciones de los flujos de la fase continua y dispersa da cabida a cocultivar distintos tipos celulares con microesferas funcionalizadas de tamaños diversos, que cubran las necesidades de cada tipo de célula.
- La técnica de *Layer-by-layer* descrita no sólo permite la funcionalización con HS y Col I, sino que ofrece la posibilidad de trabajar con cualquier biomolécula de la ECM, utilizando los contraiones de carga opuesta empleados en este trabajo.
- El sistema presentado no se limita únicamente a la hipótesis planteada, sino que es válido para el estudio del efecto individual o sinérgico de las distintas biomoléculas del nicho.
- La introducción de las microesferas en el cultivo celular no supone una limitación en relación con el crecimiento y expansión de las células, como ocurre con otro tipo de *scaffolds*.
- La presencia del biorreactor se considera esencial en el cultivo de células de mieloma múltiple dado que contribuye a mejorar significativamente la recreación del entorno tumoral *in vivo*.
- El cultivo con biorreactor de perfusión propuesto se plantea como una primera aproximación de una plataforma que mimetice el microambiente tumoral de la médula ósea.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, D. D.; MINK, P. J.; ADAMI, H. O.; COLE, P.; MANDEL, J. S.; OKEN, M. M.; TRICHOPOULOS, D. (2007). Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, 120(SUPPL. 14), 40–61.
- ALLEGRA, A.; INNAO, V.; ALLEGRA, A. G.; PUGLIESE, M.; DI SALVO, E.; VENTURA-SPAGNOLO, E.; MUSOLINO, C.; GANGEMI, S. (2019). Lymphocyte subsets and inflammatory cytokines of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 1–25.
- AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623–633.
- BARREIRO-GARCÍA, G. (2017). Insuficiencia renal en el mieloma múltiple. Análisis de factores pronósticos. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad del País Vasco, 238 pp.
- BASAK, G.; SRIVASTAVA, A.; MALHOTRA, R.; CARRIER, E. (2009). Multiple Myeloma Bone Marrow Niche. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(3), 335–346.
- BAZARBACHI, A. H.; AL HAMED, R.; MALARD, F.; HAROUSSEAU, J. L.; MOHTY, M. (2019). Relapsed refractory multiple myeloma: a comprehensive overview. *Leukemia*, 33(10), 2343–2357.
- BELLONI, D.; HELTAI, S.; PONZONI, M.; VILLA, A.; VERGANI, B.; PECCIARINI, L.; MARCATTI, M.; GIRLANDA, S.; TONON, G.; CICERI, F.; CALIGARIS-CAPPIO, F.; FERRARINI, M.; FERRERO, E. (2018). Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3d surrogate microenvironment. *Haematologica*, 103(4), 707–716.
- BERGSAGEL, P. L.; KUEHL, W. M.; ZHAN, F.; SAWYER, J.; BARLOGIE, B.; SHAUGHNESSY, J. (2005). Cyclin D dysregulation: An early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106(1), 296–303.
- BONINO, C.; EFIMENKO, K.; JEONG, S.; KREBS, M.; ALSBERG, E.; KHAN, S. (2012). Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions. *Small*, 8(12), 1928–1936.
- BRAY, L.; HUTMACHER, D.; BOCK, N. (2019). Addressing Patient Specificity in the Engineering of Tumor Models. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 7.
- BRIGLE, K.; ROGERS, B. (2017). Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, 33(3), 225–236.
- CAPRETTO, L.; MAZZITELLI, S.; BALESTRA, C.; TOSI, A.; NASTRUZZI, C. (2008). Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technology. *Lab on a Chip*, 8(4), 617–621.
- CARACCIO, C.; KRISHNA, S.; PHILLIPS, D. J.; SCHÜRCH, C. M. (2020). Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma: A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–25.

CHIECCHIO, L.; DAGRADA, G. P.; IBRAHIM, A. H.; CABANAS, E. D.; PROTHEROE, R. K. M.; STOCKLEY, D. M.; ORCHARD, K. H.; CROSS, N. C. P.; HARRISON, C. J.; ROSS, F. M. (2009). Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, 94(12), 1708–1713.

CHNG, W. J.; HUANG, G. F.; CHUNG, T. H.; NG, S. B.; GONZALEZ-PAZ, N.; TROSKA-PRICE, T.; MULLIGAN, G.; CHESI, M.; BERGSAGEL, P. L.; FONSECA, R. (2011). Clinical and biological implications of MYC activation: A common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*, 25(6), 1026–1035.

CHOE, G.; PARK, J.; PARK, H.; LEE, J. (2018). Hydrogel Biomaterials for Stem Cell Microencapsulation. *Polymers*, 10(9), 997.

CHOI, J. S.; MAHADIK, B. P.; HARLEY, B. A. C. (2015). Engineering the hematopoietic stem cell niche: Frontiers in biomaterial science. *Biotechnology Journal*, 10(10), 1529–1545.

CHOWDURY, M.; HEILEMAN, K.; MOORE, T.; YOUNG, E. (2019). Biomicrofluidic Systems for Hematologic Cancer Research and Clinical Applications. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 24(5), 457-476.

CHRAMIEC, A.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2019). Tissue engineered models of healthy and malignant human bone marrow. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 140, 78–92.

COLUCCI, S.; BRUNETTI, G.; RIZZI, R.; ZONNO, A.; MORI, G.; COLAIANNI, G.; DEL PRETE, D.; FACCIO, R.; LISO, A.; CAPALBO, S.; LISO, V.; ZALLONE, A.; GRANO, M. (2004). T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: The role of the OPG/TRAIL interaction. *Blood*, 104(12), 3722–3730.

CORRE, J.; MAHTOUK, K.; ATTAL, M.; GADELORGE, M.; HUYNH, A.; FLEURY-CAPPELLESSO, S. et al. (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*, 21(5), 1079-1088.

DABBAH, M.; ATTAR-SCHNEIDER, O.; ZISMANOV, V.; TARTAKOVER MATALON, S.; LISHNER, M.; DRUCKER, L. (2016). Multiple myeloma cells promote migration of bone marrow mesenchymal stem cells by altering their translation initiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(4), 761–770.

DALTON, W. S. (2003). The tumor microenvironment: Focus on myeloma. *Cancer Treatment Reviews*, 29(SUPPL. 1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00077-X)

DAMIANO, J. S.; CRESS, A. E.; HAZLEHURST, L. A.; SHTIL, A. A.; DALTON, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5), 1658–1667.

DÍAZ-BENITO, B. (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. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Politècnica de València. 43 pp.

DREXLER, H. G.; MATSUO, Y. (2000). Malignant hematopoietic cell lines: In vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leukemia Research*, 24(8), 681–703.

- DRURY, J.; DENNIS, R.; MOONEY, D. (2004). The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*, 25(16), 3187-3199.
- DUTTA, A. K.; FINK, J. L.; GRADY, J. P.; MORGAN, G. J.; MULLIGHAN, C. G.; TO, L. B.; HEWETT, D. R.; ZANNETTINO, A. C. W. (2019). Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*, 33(2), 457–468.
- FAKHRI, B.; VIJ, R. (2016). Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 16(August), S130–S134.
- FRIDLEY, K.; KINNEY, M.; MCDEVITT, T. (2012). Hydrodynamic modulation of pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(6), 45.
- FURUKAWA, Y.; KIKUCHI, J. (2020). Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 111(4), 496–511.
- GARCÍA CRUZ, D.; ESCOBAR IVIRICO, J.; GOMES, M.; GÓMEZ RIBELLES, J.; SÁNCHEZ, M.; REIS, R.; MANO, J. (2008). Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 2(6), 378-380.
- HAZLEHURST, L. A.; DAMIANO, J. S.; BUYUKSAL, I.; PLEDGER, W. J.; DALTON, W. S. (2000). Adhesion to fibronectin via  $\beta$ 1 integrins regulates p27(kip1) levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 19(38), 4319–4327.
- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. C.; TÉLLEZ-JURADO, L.; RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. (2020). Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. *Carbohydrate Polymers*, 229(May 2019), 115514.
- HIDESHIMA, T.; MITSIADES, C.; TONON, G.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 585–598.
- HU, Y.; WANG, Q.; WANG, J.; ZHU, J.; WANG, H.; YANG, Y. (2012). Shape controllable microgel particles prepared by microfluidic combining external ionic crosslinking. *Biomicrofluidics*, 6(2).
- JAASMA, M. J., PLUNKETT, N. A., & O'BRIEN, F. J. (2008). Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *Journal of Biotechnology*, 133(4), 490–496.
- JAKUBIKOVA, J.; CHOLUJOVA, D.; HIDESHIMA, T.; GRONESOVA, P.; SOLTYSOVA, A.; HARADA, T.; JOO, J.; KONG, S. Y.; SZALAT, R. E.; RICHARDSON, P. G.; MUNSHI, N. C.; DORFMAN, D. M.; ANDERSON, K. C. (2016). A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: Biologic and clinical applications. *Oncotarget*, 7(47), 77326–77341.
- KHAN, S.; RODRIGUEZ, E.; PATEL, R.; GOR, J.; MULLOY, B.; PERKINS, S. (2011). The Solution Structure of Heparan Sulfate Differs from That of Heparin. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(28), 24842-24854.
- LEE-THEDIECK, C.; SPATZ, J. P. (2012). Artificial niches: Biomimetic materials for hematopoietic stem cell culture. *Macromolecular Rapid Communications*, 33(17), 1432–1438.

- LI, Z.; CUI, Z. (2014). Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnology Advances*, 32(2), 243–254.
- LIU, L.; WU, F.; JU, X. J.; XIE, R.; WANG, W.; NIU, C. H.; CHU, L. Y. (2013). Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 404, 85–90.
- LOMAS, O. C.; TAHRI, S.; GHOBRIAL, I. M. (2020). The microenvironment in myeloma. *Current Opinion in Oncology*, 32(2), 170–175.
- MA, J. ; WANG, Y. ; LIU, J. (2017). Biomaterials meet microfluidics: from synthesis technologies to biological applications. *Micromachines*, 8(8).
- MANIER, S. ; DE CHARETTE DE LA CONTRIE, M. ; HIEULLE, J. ; DANIEL, A. ; FACON, T. (2019). Multiple myeloma: New criteria for diagnosis and treatment, strong therapeutic hopes. *Presse Medicale*, 48(7-8P1), 825–831.
- MATHEWS, S.; BHONDE, R.; GUPTA, P. K.; TOTEY, S. (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.
- MOLOUDIZARGARI, M.; ABDOLLAHI, M.; ASGHARI, M. H.; ZIMTA, A. A.; NEAGOE, I. B.; NABAVI, S. M. (2019). The emerging role of exosomes in multiple myeloma. *Blood Reviews*, 38, 100595.
- MORGAN, G. J.; WALKER, B. A.; DAVIES, F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 335–348.
- MYELOMA - CANCER STAT FACTS. SEER. (2020). Retrieved 18 March 2020, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>.
- NAYMAGON, L.; ABDUL-HAY, M. (2016). Novel agents in the treatment of multiple myeloma: A review about the future. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1).
- NEWSOM, J. P.; PAYNE, K. A.; KREBS, M. D. (2019). Microgels: Modular, tunable constructs for tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 88, 32–41.
- OLIVEIRA, M.; HATAMI, J.; MANO, J. (2016). Coating Strategies Using Layer-by-layer Deposition for Cell Encapsulation. *Chemistry - An Asian Journal*, 11(12), 1753-1764.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 839–845.
- PINA, S.; RIBEIRO, V. P.; MARQUES, C. F.; MAIA, F. R.; SILVA, T. H.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. (2019). Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 12(i).
- PINTO, V.; BERGANTIM, R.; CAIRES, H. R.; SECA, H.; GUIMARÃES, J. E.; VASCONCELOS, M. H. (2020). Multiple myeloma: Available therapies and causes of drug resistance. *Cancers*, 12(2), 1–32.

PYO, D. H.; HONG, H. K.; LEE, W. Y.; CHO, Y. B. (2020). Patient-derived cancer modeling for precision medicine in colorectal cancer: beyond the cancer cell line. *Cancer Biology and Therapy*, 00(00), 1–8.

RADHAKRISHNAN, J.; VARADARAJ, S.; DASH, S. K.; SHARMA, A.; VERMA, R. S. (2020). Organotypic cancer tissue models for drug screening: 3D constructs, bioprinting and microfluidic chips. *Drug Discovery Today*, 00(00).

RAJKUMAR, S. V.; KUMAR, S. (2016). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(1), 101–119.

REAGAN, M. R.; MISHIMA, Y.; GLAVEY, S. V.; ZHANG, Y.; MANIER, S.; LU, Z. N.; MEMARZADEH, M.; ZHANG, Y.; SACCO, A.; ALJAWAI, Y.; SHI, J.; TAI, Y. T.; READY, J. E.; KAPLAN, D. L.; ROCCARO, A. M.; GHOBRIAL, I. M. (2014). Investigating osteogenic differentiation in multiple myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood*, 124(22), 3250–3259.

REAKASAME, S.; BOCCACCINI, A. R. (2018). Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 19(1), 3–21.

REN, Z.; VAN ANDEL, H.; DE LAU, W.; HARTHOLT, R. B.; MAURICE, M. M.; CLEVERS, H.; KERSTEN, M. J.; SPAARGAREN, M.; PALS, S. T. (2018). Syndecan-1 promotes Wnt/b-catenin signaling in multiple myeloma by presenting Wnts and R-spondins. *Blood*, 131(9), 982–994.

RIA, R.; VACCA, A. (2020). Bone marrow stromal cells-induced drug resistance in multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2).

RICHARDSON, J. J.; BJÖRNMALM, M.; CARUSO, F. (2015). Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science*, 348(6233).

RIDLEY, R. C.; XIAO, H.; HATA, H.; WOODLIFF, J.; EPSTEIN, J.; SANDERSON, R. D. (1993). Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood*, 81(3), 767–774.

RÖLLIG, C.; KNOP, S.; BORNHÄUSER, M. (2015). Multiple myeloma. *The Lancet*, 385(9983), 2197–2208.

ROTHBAUER, M.; ROSSER, J. M.; ZIRATH, H.; ERTL, P. (2019). Tomorrow today: organ-on-a-chip advances towards clinically relevant pharmaceutical and medical in vitro models. *Current Opinion in Biotechnology*, 55, 81–86.

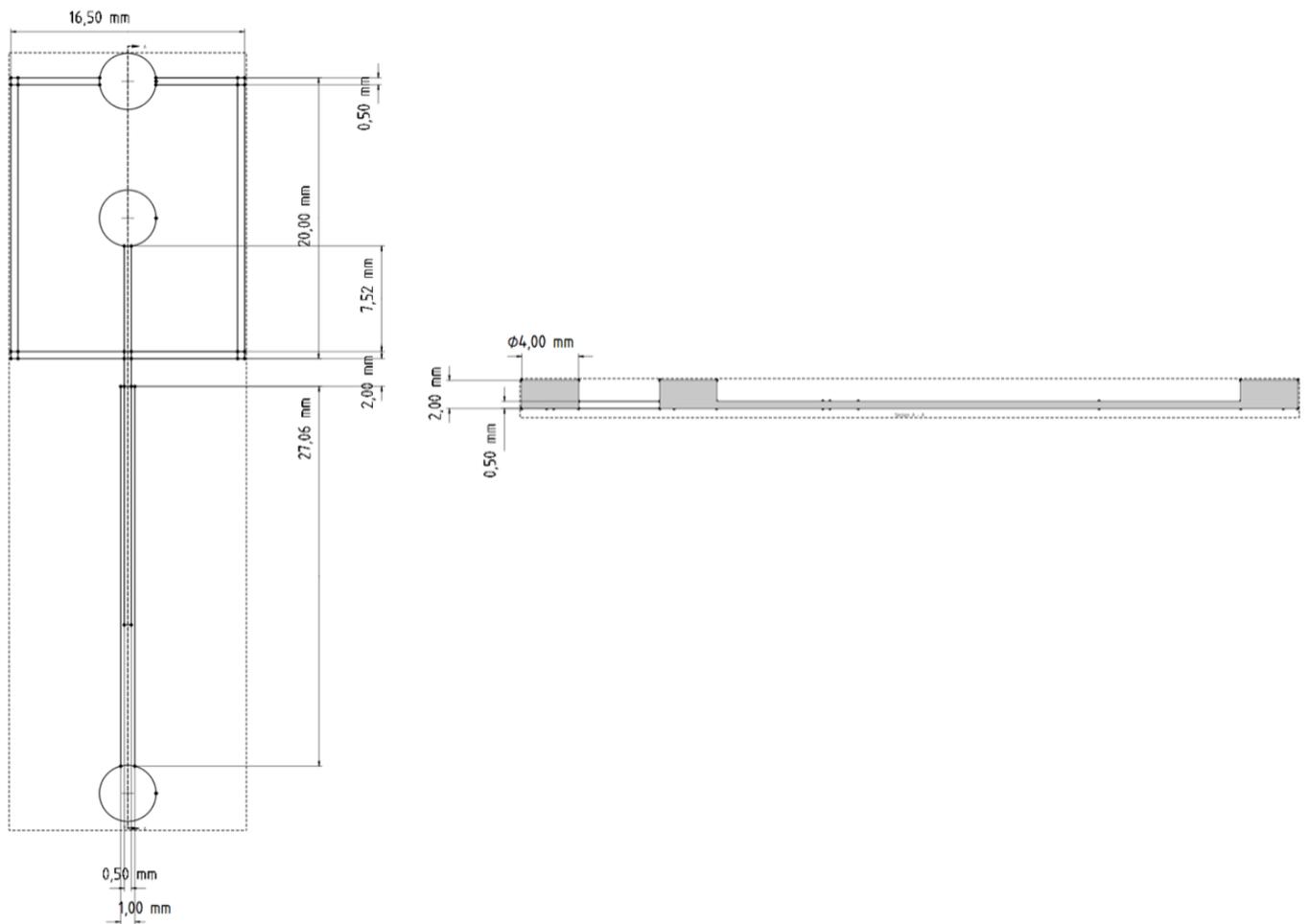
SHARIKI, S.; COX, O.; TICKELL, D.; PEREIRA MORAIS, M.; VAN DEN ELSEN, J.; JAMES, T. ET AL. (2012). Coil-by-coil assembly of poly[acrylamide-co-3-(methacryl-amido)-phenylboronic acid] with polydiallyldimethyl-ammonium to give alizarin red S responsive films. *Journal Of Materials Chemistry*, 22(36), 18999.

SIEBER, S.; WIRTH, L.; CAVAK, N.; KOENIGSMARK, M.; MARX, U.; LAUSTER, R.; ROSOWSKI, M. (2018). Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), 479–489.

- SMITH, P.; MALLIA, A.; HERMANSON, G. (1980). Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. *Analytical Biochemistry*, 109(2), 466-473.
- SONTHEIMER-PHELPS, A.; HASSELL, B.; INGBER, D. (2019). Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nature Reviews Cancer*, 19(2), 65-81.
- SPELAT, R.; FERRO, F.; CONTESSOTTO, P.; WARREN, N. J.; MARSICO, G.; ARMES, S. P.; PANDIT, A. (2020). A worm gel-based 3D model to elucidate the paracrine interaction between multiple myeloma and mesenchymal stem cells. *Materials Today Bio*, 5(January), 100040.
- SUSI, H.; ARD, J.; CARROLL, R. (1971). The infrared spectrum and water binding of collagen as a function of relative humidity. *Biopolymers*, 10(9), 1597-1604.
- SWAYDEN, M.; SOUBEYRAN, P.; IOVANNA, J. (2020). Upcoming Revolutionary Paths in Preclinical Modeling of Pancreatic Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9(January), 1–12.
- TANCREDE, T. M.; BELCH, A. R.; REIMAN, T.; PILARSKI, L. M.; KIRSHNER, J. (2009). Altered expression of fibronectin and collagens I and IV in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(3), 239–247.
- THOMAS, D.; O'BRIEN, T.; PANDIT, A. (2018). Toward Customized Extracellular Niche Engineering: Progress in Cell-Entrapment Technologies. *Advanced Materials*, 30(1), 1–20.
- UTECH, S.; PRODANOVIC, R.; MAO, A. S.; OSTAFE, R.; MOONEY, D. J.; WEITZ, D. A. (2015). Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture. *Advanced Healthcare Materials*, 4(11), 1628–1633.
- VAN HOOGMOED, C.; BUSSCHER, H.; DE VOS, P. (2003). Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 67A(1), 172-178.
- VANDERBURGH, J.; STERLING, J.; GUELCHER, S. (2016). 3D Printing of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening. *Annals Of Biomedical Engineering*, 45(1), 164-179.
- VEERABADRAN, N. G.; GOLI, P. L.; STEWART-CLARK, S. S.; LVOV, Y. M.; MILLS, D. K. (2007). Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromolecular Bioscience*, 7(7), 877–882.
- ZAHR, A. S. (2007). Solid core-shell drug nanoparticles for therapeutic delivery. Thesis in Chemical Engineering. Pennsylvania State University. 248 pp.
- ZHANG, W.; LEE, W. Y.; SIEGEL, D. S.; TOLIAS, P.; ZILBERBERG, J. (2014). Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 20(8), 663–670.
- ZHAO, M. Y.; LI, L. H. ; LI, B. ; ZHOU, C. R. (2014). LBL coating of type I collagen and hyaluronic acid on aminolyzed PLLA to enhance the cell-material interaction. *Express Polymer Letters*, 8(5), 322–335.

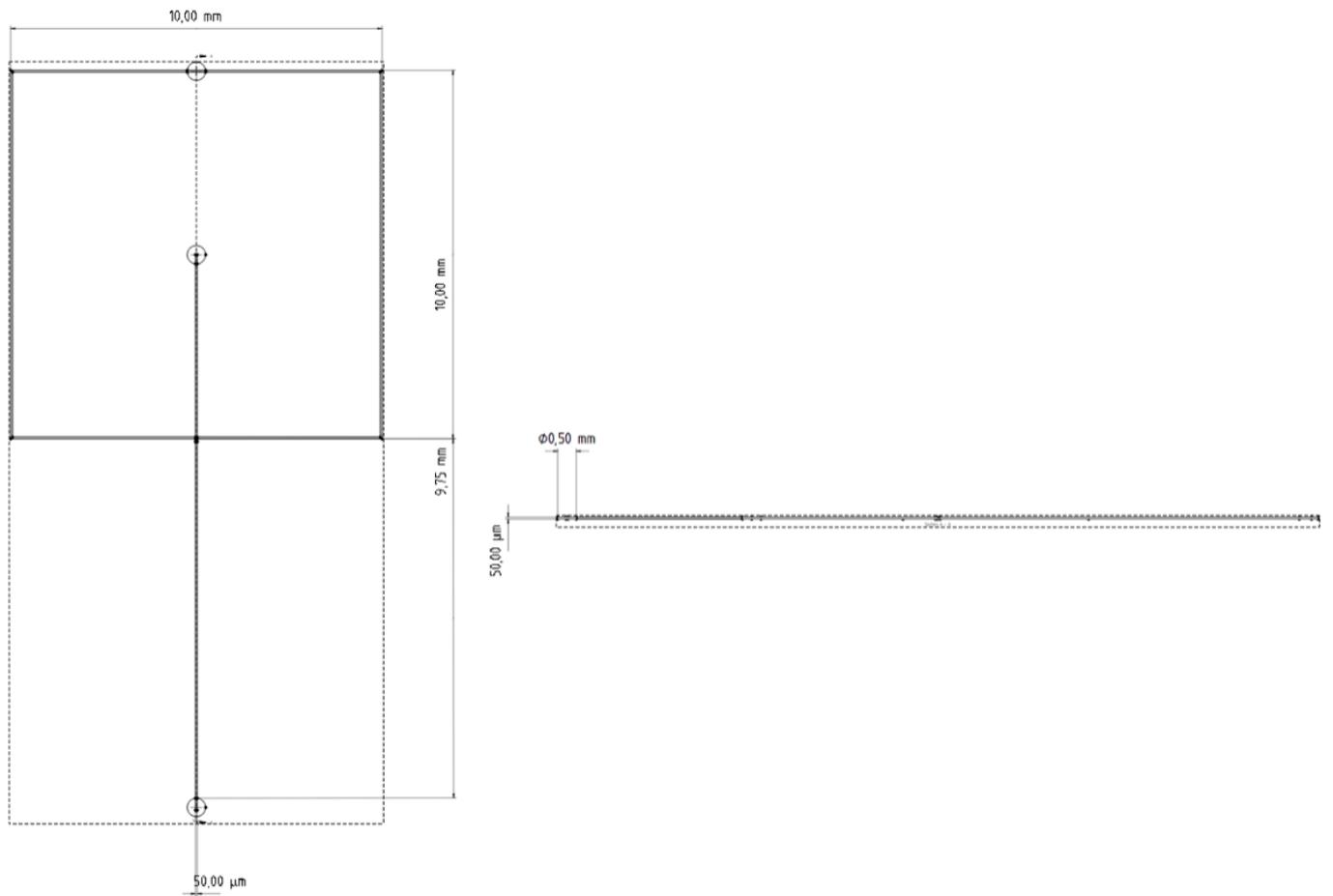
## ANEXO I. DIBUJOS TÉCNICOS. <sup>1</sup>

En este anexo se incluyen los dibujos técnicos correspondientes a los dos circuitos de microfluídica empleados y al biorreactor de perfusión que se propone en el trabajo.

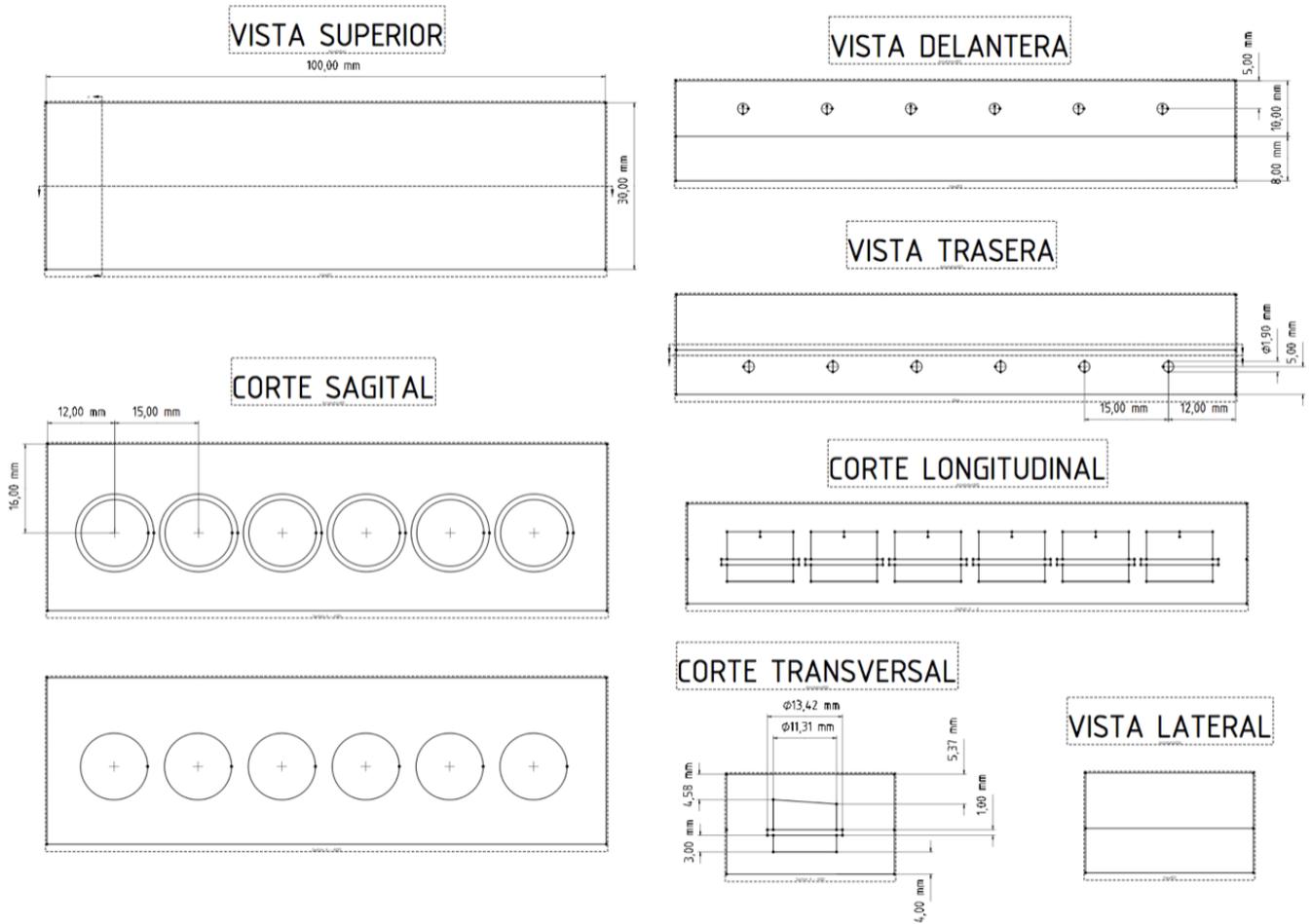


**Figura A.** Dibujo técnico del circuito de microfluídica con un tamaño de canal de  $500\ \mu\text{m}$  y dimensiones de  $16,5 \times 50$  mm obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.

<sup>1</sup> Dibujos técnicos realizados gracias a la ayuda de Luis Amaro Martins.



**Figura B.** Dibujo técnico del circuito de microfluídica con un tamaño de canal de 50 μm y dimensiones de 10 x 20 mm obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.



**Figura C.** Dibujo técnico del biorreactor para el cultivo celular obtenido con la herramienta TechDraw de FreeCAD.