



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biotecnología

3D CULTURE OF MULTIPLE MYELOMA CELL LINE USING MICROGEL ENVIRONMENTS

Juan Carlos Marín Payá

Codirectores: Dr. Amparo Sempere Talens, Dr. José Luis Gómez Ribelles

Resumen

El mieloma múltiple es una neoplasia hematológica caracterizada por una expansión descontrolada de células plasmáticas monoclonales (mPCs) en medula ósea que producen, en la mayoría de los casos, un componente monoclonal secretado en el suero y/o en orina. En la actualidad, se sigue considerando una enfermedad incurable con la constante aparición de recaídas en los pacientes. Una de las causas que condicionan esta situación, radica en la generación de resistencia frente a fármacos por parte de las mPCs. Este mecanismo de resistencia a fármacos (DR) se ha visto que no solo depende de factores intracelulares, sino que la propia interacción de las mPCs con el microambiente medular juega un papel fundamental para su supervivencia, crecimiento y desarrollo de DR. Entre los componentes del microambiente tumoral, destaca la adhesión de las mPCs a componentes de la matriz extracelular (ECM) que se ha visto relacionada con la generación de DR. Por este motivo el desarrollo de esta tesis doctoral consistió en la

elaboración y validación de una plataforma de cultivo 3D basado en la síntesis de un microgel. Este sistema estará constituido por microesferas funcionalizadas con componentes de la ECM como son la fibronectina (FN), colágeno tipo I (COL), heparina (Hep), heparan sulfato (HS) y ácido hialurónico (HA), generando un entorno 3D biomimético con la capacidad de poder analizar la respuesta celular desencadenada por la interacción de las mPCs con los componentes de la ECM, así como la DR generada por la adhesión de las mPCs a estas biomoléculas.

El primer estudio consistió en la realización y puesta a punto de varios protocolos para la síntesis de distintos microgeles; un primer sistema se produjo mediante la polimerización por vía radical en bloque de co-polímeros de poliacrilato de etilo (EA) y polimetacrilato de etilo (EMA) o bien por EA, EMA y ácido acrílico (AAc). Mediante una emulsión del tipo aceite en agua se consiguió producir con estos copolímeros, microesferas de un tamaño próximo al de las mPCs. Un segundo sistema se basó en microesferas de alginato. Estas microesferas se obtuvieron en un dispositivo de microfluidica produciéndose la gelificación externa de las micro-gotas con la incorporación de iones de calcio consiguiendo microesferas de un tamaño medio de 177 μm . Debido a la gran variedad de microesferas sintetizadas con diferentes grupos químicos en sus superficies, se consiguió establecer protocolos de funcionalización similares a los establecidos en la literatura, teniendo en cuenta la estabilidad de la biomolécula a lo largo del tiempo del cultivo celular. Este enfoque, permitió la funcionalización con una gran variedad de biomoléculas disponiendo así de microgeles funcionalizados con FN, COL, Hep, HS y HA.

Una vez desarrollados los microgeles, en un segundo estudio se procedió a evaluar la respuesta celular en un entorno 3D basado en microgel, valorando la interacción con los componentes de la ECM. Entre los resultados observados se pudo determinar como el tamaño de las microesferas afecta al crecimiento celular incluso en ausencia de cualquier funcionalización. Con los microgeles constituidos por microesferas de un tamaño próximo al de las mPCs se obtuvo un mayor crecimiento celular que con los microgeles formados por partículas de mayor tamaño, y en ambos el crecimiento fue superior al del cultivo en suspensión. Se plantea la hipótesis de que la presencia de las microesferas favorece en gran medida que se produzca un mayor contacto célula-célula que se ve incrementado cuanto mayor es la superficie específica del microgel. Entre los componentes de la ECM estudiados, mientras que el COL no genera ninguna respuesta celular diferente al control (microgel no funcionalizado), el HA favorece la proliferación

celular. La adhesión de las mPCs a la FN condiciona el bloqueo de las células en la fase G_0 - G_1 del ciclo celular. Esta adhesión está mediada por la integrina $\alpha_4\beta_1$. Al incrementar la actividad de la integrina β_1 mediante la incorporación de cationes divalente Mn^{2+} se consiguió aumentar la adhesión de las mPCs a la FN, observando de manera independiente que el incremento de la actividad de la integrina β_1 reduce el crecimiento celular. En el caso de la Hep y HS los resultados mostrados hacen indicar que ambas biomoléculas tienen un efecto nocivo para la célula, presentando en ambas condiciones una elevada mortalidad. Estos resultados junto a que ninguno de los microgeles no funcionalizados generó citotoxicidad, permitieron validar el desarrollo de una plataforma de cultivo 3D en donde los componentes de la ECM son capaces de interactuar con las mPCs generando una respuesta celular diferente según la biomolécula de estudio.

Por último, para corroborar que nuestra plataforma puede ser útil en la valoración de la respuesta a fármacos, se estudió la DR generada por la adhesión de las mPCs a los componentes de la ECM empleando dexametasona (DEX) y bortezumib (BRZ). Los resultados indicaron que mientras las condiciones de microgel sin funcionalizar no generan ningún tipo de interferencia con los fármacos, los microgeles funcionalizados con HA, COL y FN a través de su adhesión a las mPCs fueron capaces de desarrollar resistencia frente a la DEX, fenómeno observado en la literatura en el caso del HA y FN y que ha sido un hallazgo novedoso en el caso del COL. Estas adhesiones no generaron ningún tipo de DR frente a BRZ. Una de las características del BRZ es reducir la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_1$. Dado que la adhesión de las mPCs a la FN esta mediada por esta integrina, la acción conjunta de DEX y BRZ, permitió por acción del BRZ revertir la adhesión de las células a la FN, siendo nuevamente las mPCs susceptibles a la acción de la DEX.