

Resumen

En las últimas décadas, la ingeniería tisular ha evolucionado desde el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran la función de un tejido, hacia el modelado de la fisiología humana *in vitro*, con especial atención a la medicina de precisión, el cribado de fármacos y el modelado de enfermedades. En la médula ósea (BM) las células madre hematopoyéticas, a través de la hematopoyesis, originan las células de la sangre y el sistema inmune. Diferentes células residentes en la BM, mediadores solubles y elementos no celulares como la matriz extracelular (ECM) regulan este proceso. El complejo microambiente de la BM es también el hogar de algunos procesos malignos, y las intrincadas interacciones que mantienen la fisiología de las HSC también respaldan las neoplasias hematológicas. El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por una proliferación aberrante y acumulación en la BM de células plasmáticas monoclonales. En las últimas décadas, los tratamientos han mejorado, sin embargo, el MM sigue siendo incurable, ya que la mayoría de los pacientes recaen y se vuelven refractarios a las terapias. Diferentes causas están involucradas en la generación de resistencia a fármacos (DR), una de las más relevantes es el microambiente tumoral. Moléculas de ECM como la fibronectina (FN) o el ácido hialurónico (HA) tienen un papel reconocido en la generación de DR en MM. La inadecuación de los modelos preclínicos bidimensionales en la reproducción del microambiente tumoral es una de las bases del problema clínico de DR, por lo que se han intentado diferentes enfoques para reconstruir el microambiente MM *in vitro*. Sin embargo, todos estos estudios se basan en hidrogeles y andamios celulares diseñados para células adherentes, mientras que las células de MM presentan crecimiento en suspensión. Sería de gran relevancia desarrollar modelos 3D capaces de respetar su naturaleza dinámica y no adherente. Las microesferas como biomateriales ofrecen una gran versatilidad para ensamblar un microambiente de naturaleza semisólida, formado por microesferas y células en suspensión. Además, pueden funcionalizarse con moléculas de la ECM para aumentar su biomimetismo. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es desarrollar, optimizar y validar una plataforma de cultivo 3D, denominada microgel, basada en microesferas en un medio líquido y que coexisten con células de MM creciendo dinámicamente en suspensión.

En el primer capítulo experimental se desarrollaron y caracterizaron diferentes microesferas con diferentes funcionalizaciones para su posterior implementación en la plataforma de cultivo 3D. Optimizamos un protocolo de polimerización en suspensión para la obtención de microesferas a base de acrilatos con dos composiciones diferentes:

con presencia (10%) o ausencia (0%) de ácido acrílico (AA). La topografía y el tamaño se caracterizaron mediante microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM). Se obtuvieron dos distribuciones de tamaño diferentes (< 60 y > 70 μm de diámetro). La presencia de AA en la superficie de microesferas de AA al 10 % se caracterizó minuciosamente mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), análisis termogravimétrico (TGA) y tinción con azul de toluidina O. La FN se adsorbió físicamente en la superficie de la microesfera, mientras que el HA, colágeno I y diferentes secuencias peptídicas se injertaron covalentemente. Todas las funcionalizaciones fueron confirmadas por XPS y técnicas colorimétricas. Como alternativa a las microesferas de acrilatos, se modificaron las microesferas comerciales Cytodex 1 para adaptar sus características a la plataforma del microgel. Se utilizaron técnicas capa por capa (LbL) para introducir HA y sulfato de condroitina (CS) en la superficie de las Cytodex 1. La presencia de los recubrimientos de LbL fue confirmada por cryoFESEM y cuantificada por TGA. El par de LbL quitosano/CS generó multicapas más gruesas que el quitosano/HA. Se utilizaron dos agentes de reticulación diferentes, glutaraldehído y carbodiimida. Por tanto, se ha generado un amplio repertorio de microesferas con diferentes características para desarrollar microgeles.

En el segundo capítulo experimental, se optimizaron y validaron las condiciones de cultivo para la plataforma de microgel con 3 líneas celulares de MM diferentes. Los microgeles basados en microesferas de acrilatos se han utilizado ampliamente para este propósito. Determinamos que el tamaño de las microesferas tiene un papel relevante en la proliferación celular: las microesferas de tamaño celular (< 60 μm de diámetro) mostraron una mayor proliferación de las líneas RPMI8226, U226 y MM1.S. Se necesita agitación para mantener las microesferas y las células en suspensión; el aumento de la velocidad de agitación tuvo un efecto negativo en la proliferación de RPMI8226 en cultivos en suspensión convencionales. Sin embargo, los microgeles redujeron este efecto negativo. Las condiciones óptimas de cultivo se establecieron como 150 rpm de velocidad de agitación utilizando un agitador orbital y microesferas de < 60 μm de diámetro. Con estas condiciones, los microgeles con diferentes composiciones (0% AA, 10% AA) y funcionalizaciones (ninguna, HA, FN, colágeno 1 y secuencias peptídicas) permitieron una buena proliferación de las líneas RPMI8226, U226 y MM1.S en condiciones 3D. Todos los sistemas respetaron el patrón de crecimiento en suspensión, factor que ha demostrado ser clave para su buen desempeño en cultivo 3D. Los microgeles recubiertos con FN fueron los únicos en los que la formación de agregados célula-célula, microesfera-microesfera y célula-microesfera tuvo lugar. En estudios iniciales de DR en la plataforma de microgel, encontramos que la línea celular

RPMI8226 cultivada en microgeles que contenían AA mostró una resistencia significativamente mayor a la dexametasona que sus cultivos en suspensión convencionales. Y que las líneas celulares RPMI8226, U226 y MM1.S cultivadas en microgeles que contenían AA mostraron una resistencia significativamente mayor a bortezomib que sus cultivos en suspensión convencionales. Por lo tanto, la presencia de AA en la matriz polimérica de las microesferas mostró un efecto positivo en la generación de DR *in vitro* y requerirá más estudios. Se ha validado la reducción de escala del sistema para trabajar con volúmenes más pequeños de microesferas y números reducidos de células, lo que es de gran relevancia para su futura traslación clínica. Finalmente, se han realizado cultivos preliminares con la línea celular RPMI8226 en los microgeles basados en Cytodex 1. Las microesferas de Cytodex 1 sin modificación tuvieron un efecto negativo sobre la viabilidad de las células de MM. La modificación mediante LbL con los pares quitosano/CS y quitosano/HA aumentó la viabilidad y proliferación de células de MM. Sin embargo, estos sistemas no respetaron el carácter no adherente de las células MM. De los dos métodos de entrecruzamiento probados, el glutaraldehído dio como resultado una menor viabilidad celular mientras que la carbodiimida mantuvo la buena viabilidad celular de los microgeles no entrecruzados.