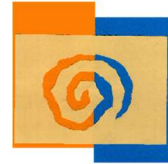




UNIVERSITAT  
POLITÀCNICA  
DE VALÈNCIA



Centre for Biomaterials  
and Tissue Engineering  
Universitat  
Politàcnica de València

## **Univeristat Politècnica de València**

*Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio  
Natural*

### ***Estudio de viabilidad de células de mieloma múltiple cultivadas en entornos tridimensionales biomiméticos de médula ósea.***

TRABAJO FIN DE GRADO

TITULACIÓN: Grado en Biotecnología

CURSO ACADÉMICO: 2018/2019

ALUMNA: Ángela Esteban Arias

TUTOR: José Luis Gómez Ribelles

COTUTORA: Sandra Clara Trujillo

VALENCIA, JULIO 2019

**TÍTULO:** Estudio de viabilidad de células de mieloma múltiple cultivadas en entornos tridimensionales biomiméticos de médula ósea.

**RESUMEN:**

Actualmente la producción de modelos de médula ósea tridimensionales supone un reto en el campo de la ingeniería tisular ya que permitiría el avance hacia tratamientos personalizados en pacientes de mieloma múltiple y otras enfermedades. En este proyecto se ha desarrollado un microgel biomimético para reproducir el entorno 3D de la médula ósea *in vitro*. El objetivo principal ha sido la obtención del microgel, su funcionalización con biomoléculas de la matriz extracelular y la evaluación de la biocompatibilidad del sistema propuesto con técnicas de cultivo celular.

El microgel está formado por microesferas poliméricas de acrilato de etilo, metacrilato de etilo, dimetilacrilato de etilenglicol y ácido acrílico. Mediante microscopía electrónica de barrido se han caracterizado las microesferas poliméricas, analizándose su tamaño y morfología. Con el objetivo de generar una plataforma biomimética para las células de mieloma múltiple, las microesferas poliméricas han sido funcionalizadas en su superficie con ácido hialurónico, biomolécula presente de forma natural en la matriz extracelular de la médula ósea. Una vez injertadas, las microesferas funcionalizadas han sido caracterizadas, mediante técnicas espectroscópicas, para asegurar la incorporación de ácido hialurónico.

Para evaluar la viabilidad y proliferación celular en el material, se han realizado dos tipos de ensayos (LIVE/DEAD y cuantificación del DNA) con la línea celular de mieloma múltiple U266, previamente caracterizada a través de microscopía y citometría de flujo. Con el ensayo LIVE/DEAD se ha determinado que el microgel es biocompatible ya que no afecta a la viabilidad celular de forma negativa. Mientras que con la cuantificación del DNA se ha demostrado que las células proliferan *in vitro* hasta 6 días de cultivo. Por lo que se ha mantenido la viabilidad y proliferación celular durante los 6 días de ensayo.

En definitiva, el microgel supone un sistema tridimensional de cultivo *in vitro* que es capaz de sostener la viabilidad de las células del mieloma múltiple, la posibilidad de injertar la superficie de las microesferas componentes específicos de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico abre la puerta a mimetizar las condiciones de la médula ósea. Por ende, se ha conseguido fabricar un modelo muy prometedor para el estudio de la medicina personalizada en pacientes de mieloma múltiple.

**PALABRAS CLAVE:** microesferas, ácido hialurónico, cultivos tridimensionales, biocompatibilidad, ingeniería tisular.

**ABSTRACT:**

Currently the production of three-dimensional bone marrow models is a challenge in the field of tissue engineering because would allow the advancement towards personalized treatments in patients with multiple myeloma and other diseases. In this project a biomimetic microgel has been developed to reproduce the 3D environment of the bone marrow *in vitro*. The main objective has been the obtaining of the microgel, its functionalization with biomolecules of the extracellular matrix and the evaluation of the biocompatibility of the proposed system with cell culture techniques.

The microgel is formed by polymeric microspheres of ethyl acrylate, methyl methacrylate, ethylene glycol dimethylacrylate and acrylic acid. By means of scanning electron microscopy, the

polymeric microspheres have been characterized to analyse their size and morphology. In order to generate a biomimetic platform for multiple myeloma cells, the polymeric microspheres have been functionalized on their surface with hyaluronic acid, a biomolecule naturally present in the extracellular matrix of the bone marrow. Once grafted, the functionalized microspheres have been characterized, by means of spectroscopic techniques, to ensure the incorporation of hyaluronic acid.

To evaluate the viability and cell proliferation in the material, two types of tests (LIVE / DEAD and DNA quantification) were performed with the cell line U266, previously characterized through microscopy and flow cytometry. With the LIVE / DEAD assay, it has been determined that the microgel is biocompatible since it does not affect cell viability negatively. While with the quantification of the DNA it has been demonstrated that the cells proliferate in vitro until 6 days of culture. Therefore, cell viability and proliferation have been maintained during the 6 days of testing.

In short, the microgel involves a three-dimensional system of in vitro culture that is capable of sustaining the viability of multiple myeloma cells, the possibility of grafting the surface of the microspheres specific components of the extracellular matrix, as hyaluronic acid opens the door to mimic the conditions of the bone marrow. Consequently, a promising model for the study of personalized medicine in patients with multiple myeloma has been produced.

**KEY WORDS:** microspheres, hyaluronic acid, three-dimensional cultures, biocompatibility, tissue engineering.

**AUTORA:** Ángela Esteban Arias.

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, Julio 2019.

**TUTOR:** José Luis Gómez Ribelles.

**COTUTORA:** Sandra Clara Trujillo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera dar las gracias a mi tutor José Luis por darme la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). Del mismo modo, quiero agradecer a mi cotutora Sandra por su dedicación y amabilidad. Además, de haber compartido tantos conocimientos conmigo.

También a Ana y Lara por crear inolvidables recuerdos durante estos 4 años de carrera y ayudarme siempre que lo he necesitado. A mis amigas del colegio Entrenaranjos Sara, Bea y Lidia por soportar todos mis altibajos durante la realización de este trabajo. A Esperanza por haber despertado mi curiosidad por el mundo de la investigación científica.

A mi familia por darme fuerzas para seguir hacia adelante y no dejar que me rindiese y, por último, a mi pareja Ivan, gracias por creer en mí.

*“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.”*

Johann Wolfgang Von Goethe

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. EL MIELOMA MÚLTIPLE	1
1.2. MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA	3
1.3. INGENIERÍA TISULAR: CULTIVOS 3D VS CULTIVOS 2D	6
1.4. POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN	8
1.5. FUNCIONALIZACIÓN Y MODELOS DE MÉDULA ÓSEA ACTUALES	11
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS	13
3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	14
3.2.1 <i>Microesferas poliméricas</i>	14
3.2.1.1. Obtención de microesferas poliméricas de acrilatos y ácido acrílico	14
3.2.1.2. Caracterización morfológica de las microesferas mediante microscopia electrónica de barrido	15
3.2.1.3 Caracterización del AA en las microesferas con FT-IR	16
3.2.1.4. Distribución de tamaños de las microesferas	16
3.2.2 <i>Microesferas poliméricas con HA</i>	16
3.2.2.1 Funcionalización de las microesferas poliméricas	16
3.2.2.2 Caracterización de la funcionalización de las microesferas con TBO	17
3.3. CULTIVOS CELULARES	18
3.3.1 <i>Caracterización de la línea celular U266</i>	18
3.3.2 <i>Obtención del cultivo 3D</i>	19
3.3.3 <i>Ensayo de la viabilidad celular mediante LIVE/DEAD</i>	20
3.3.4 <i>Ensayo de la proliferación celular</i>	21
3.3.5 <i>Cultivos celulares alternativos</i>	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS POLIMÉRICAS	23
4.1.1 <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	23
4.1.2 <i>Técnica de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier</i>	24
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS MEDIANTE TBO	25
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR U266	26
4.4 CULTIVOS 3D	28
4.4.1 <i>Ensayo de viabilidad celular, LIVE/DEAD</i>	28
4.4.2 <i>Ensayo de proliferación celular</i>	31
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>40</b>
7.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS FUNCIONALIZADAS MEDIANTE TBO	40
7.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DEL DNA	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> REPRESENTACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE .....	<b>2</b>
<b>FIGURA 2.</b> INTERACCIONES INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS EN EL MIELOMA MÚLTIPLE .....	<b>4</b>
<b>FIGURA 3.</b> ESTRUCTURA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO .....	<b>5</b>
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTACIÓN DE UN CULTIVO BIDIMENSIONAL Y TRIDIMENSIONAL.....	<b>6</b>
<b>FIGURA 5.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL PVA. ....	<b>9</b>
<b>FIGURA 6.</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DEL EA (a), EMA (b), EGDMA (c) Y AA (d).....	<b>9</b>
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BPO.....	<b>10</b>
<b>FIGURA 8.</b> PROCESO DE NUCLEACIÓN HOMOGÉNEA EN UNA EMULSIÓN O/W. ....	<b>11</b>
<b>FIGURA 9.</b> MONTAJE EXPERIMENTAL EMPLEADO EN LA FABRICACIÓN DE MICROESFERAS. ....	<b>14</b>
<b>FIGURA 10.</b> MICROESFERAS POLIMÉRICAS.....	<b>23</b>
<b>FIGURA 11.</b> DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE LAS MICROESFERAS POLIMÉRICAS.....	<b>24</b>
<b>FIGURA 12.</b> ESPECTROS DEL ENSAYO FT-IR. ....	<b>25</b>
<b>FIGURA 13.</b> RESULTADOS DEL ENSAYO TBO .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 14.</b> DOTPLOTS DEL INMUNOFENOTIPO DE LA LÍNEA CELULAR U266 UTILIZANDO CITOMETRÍA DE FLUJO .....	<b>27</b>
<b>FIGURA 15.</b> IMÁGENES DE UNA SUSPENSIÓN CELULAR DE CÉLULAS PLASMÁTICAS MALIGNAS DE LA LÍNEA U266 TOMADAS CON UN MICROSCOPIO ÓPTICO INVERTIDO.....	<b>28</b>
<b>FIGURA 16.</b> PORCENTAJES DE VIABILIDAD DEL ENSAYO LIVE/DEAD.....	<b>29</b>
<b>FIGURA 17.</b> IMÁGENES DEL ENSAYO LIVE/DEAD A TIEMPOS 0, 2, 4 Y 6 DÍAS. ....	<b>30</b>
<b>FIGURA 18.</b> REPRESENTACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS A DISTINTOS TIEMPOS OBTENIDAS A PARTIR DE LAS IMÁGENES DEL LIVE/DEAD. ....	<b>30</b>
<b>FIGURA 19.</b> RESULTADOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR OBTENIDOS MEDIANTE EL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DEL DNA.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 20.</b> RESULTADOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE UN CULTIVO CELULAR ALTERNATIVO CON EL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DEL DNA.....	<b>33</b>
<b>FIGURA 21.</b> RESULTADOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR CON MÉTODOS DE DIGESTIÓN MÁS AGRESIVOS MEDIANTE EL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DEL DNA .....	<b>34</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1. RECEPTORES Y LIGANDOS CLAVES EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS.....</b>	<b>3</b>
<b>TABLA 2. MARCADORES SUPERFICIALES E INTRACELULARES ANALIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR U266. ....</b>	<b>19</b>
<b>TABLA 3. PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE LAS MICROESFERAS POLIMÉRICAS .....</b>	<b>24</b>
<b>TABLA 4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO TBO.....</b>	<b>40</b>
<b>TABLA 5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DEL DNA. ....</b>	<b>40</b>

## **ABREVIATURAS**

1L: primera línea de tratamiento.

2D: cultivos bidimensionales.

2L: segunda línea de tratamiento.

3D: cultivos tridimensionales.

3L: tercera línea de tratamiento.

AA: ácido acrílico.

ATR: reflectancia total atenuada.

bFGF: factor de crecimiento básico para fibroblastos.

BM: médula ósea.

BPO: peróxido de benzoílo.

CAM-DR: resistencia a fármacos mediada por adhesión.

CD138: sindecano-1.

CDK: inhibidores de quinasa dependiente de ciclina.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DPBS: buffer fosfato salino.

EA: acrilato de etilo.

ECM: matriz extracelular.

EDC: hidrocloreuro-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida.

EGDMA: dimetilacrilato de etilenglicol.

EMA: metacrilato de etilo.

EtOH: etanol.

FBS: suero fetal bovino.

FESEM: microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.

FN: fibronectina.

FT-IR: técnica de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.

GPC: cromatografía de permeación en gel.

HA: ácido hialurónico.

HCL: ácido clorhídrico.

HGF: factor de crecimiento básico para hepatocitos.

HSCs: células madre hematopoyéticas.



HSPG: heparán sulfato.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1.

Igs: inmunoglobulinas.

IL-1 $\beta$ : interleucina 1- $\beta$ .

IL-6: interleucina-6.

IR: radiación infrarroja.

JNKs: c-Jun-N-terminal.

LFA-1: integrina  $\beta$ 2 asociada al antígeno leucocitario funcional 1.

LFA-3: antígeno leucocitario funcional 3.

M: proteína monoclonal.

MEHQ: monometil éter hidroquinona.

MGUS: gammapatía monoclonal de significado incierto.

MM: mieloma múltiple.

MPT: Melfalán, Prednisona y Talidomida.

MSCs: células madre mesenquimales.

NCAM: molécula de adhesión celular neural.

NHS: N-hidroxisuccinimida.

O/W: agua en aceite.

PEG-di-NH<sub>2</sub>: polietilenglicol diamina.

PEO: PEG-di-NH<sub>2</sub>.

PTZ: fenotiazina.

PVA: poli(alcohol vinílico).

RANKL: activador del receptor del ligando NF- $\kappa$ B.

RHAMM: receptor de la motilidad mediada por HA.

SMM: mieloma múltiple latente.

TBO: azul de toluidina O.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta.

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

UV: ultravioleta.

VCAM-1: molécula 1 de adhesión a células vasculares.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

VLA-1: antígeno muy tardío 1.

VLA-4: antígeno muy tardío 4.

VMP: Melfalán, Prednisona y Bortezomib.

Z: altura total.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El Mieloma múltiple.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por la alteración de células plasmáticas monoclonales y su acumulación en la médula ósea (BM). En condiciones normales, las células plasmáticas se forman por la maduración de los linfocitos B y producen inmunoglobulinas (Igs) para combatir agentes invasores. En cambio, cuando las células plasmáticas se vuelven malignas sintetizan descontroladamente la proteína monoclonal (M), la cuál puede ser detectada en el suero y/u orina, y puede ocasionar daño renal por la producción de cadenas ligeras o por hiperviscosidad a causa de la acumulación de elevadas cantidades de proteína M en la sangre (Kyle & Rajkumar, 2009).

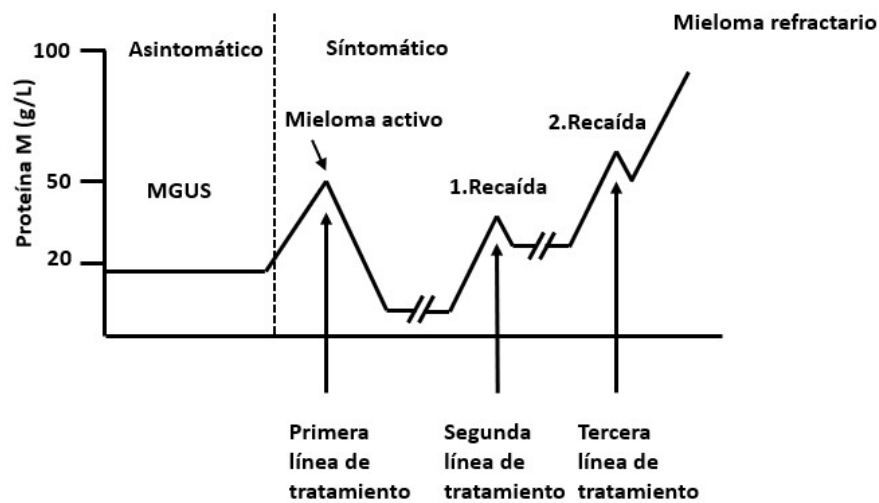
Las células plasmáticas tumorales, además de ocasionar daño renal, pueden afectar a los huesos, ya que al concentrarse en la BM e interactuar con su microambiente inhiben los osteoblastos y aumentan la acción de los osteoclastos, por tanto, mejoran la resorción ósea y suprimen la formación del hueso causando importantes lesiones óseas y dolor en los pacientes (Matsumoto & Abe, 2006).

En cuanto a la importancia epidemiológica, el MM representa el 1% de todas las neoplasias y aproximadamente el 10% de las hemopatías malignas (Kyle & Rajkumar, 2008). Normalmente suele afectar a personas mayores de 60 años, siendo la edad media en el momento del diagnóstico de 66 años. La incidencia de esta enfermedad se sitúa en unos 2,1 casos por cada 100.000 personas y año (Cowan *et al.*, 2018), siendo la tasa media de supervivencia de unos 5,2 años (Kumar *et al.*, 2014). Aun así, el desarrollo de esta enfermedad es muy heterogéneo, ya que depende de las características del paciente, y, por tanto, la tasa de supervivencia es muy variable.

El MM tiene una patogénesis con múltiples etapas que involucran distintas mutaciones genéticas causantes de alterar el comportamiento normal de las células plasmáticas. Habitualmente, se desarrolla a partir de un periodo asintomático, donde se produce la expansión clonal de células plasmáticas tumorales, denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Mientras que en algunas personas suele evolucionar desde una etapa asintomática más avanzada y con un mayor riesgo de progresión a malignidad, conocida como mieloma múltiple latente (SMM). Ambas etapas premalignas no muestran síntomas clínicos de MM, pero pueden dar lugar a MM sintomático activo a través de más alteraciones genéticas como translocaciones cromosómicas, pequeñas inserciones, eliminación de genes, variaciones en el número de copias de uno o más genes y aneuploidías. Los principales genes que sufren estas mutaciones y que conllevan a la activación del mieloma múltiple son KRAS, NRAS, TP53, BRAF, FAM46C y DIS3 (Dutta *et al.*, 2019; Kyle & Rajkumar, 2009).

En cuanto al tratamiento del MM, existen diversos fármacos para combatir esta enfermedad que se diferencian por su composición, diana terapéutica y/o mecanismo de acción. Los fármacos van destinados a reducir la masa tumoral, retrasar la progresión del mieloma y mejorar las condiciones de vida y supervivencia de los pacientes. Dentro de los tipos de tratamientos disponibles más comunes se encuentra la quimioterapia convencional (Melfalán, Ciclofosfamida, Prednisona y Vincristina, entre otros), esteroides, terapias de altas dosis y trasplante de células madre de la médula ósea. Sin embargo, estos tratamientos están siendo desplazados por la aparición de nuevos agentes terapéuticos como los inhibidores del proteasoma (Bortezomib), y los agentes inmunomoduladores (Lenalidomida, Pomalidomida y Talidomida). Ambas clases de agentes terapéuticos consiguen aumentar la tasa de respuesta y supervivencia global por lo que son el tratamiento estándar para la quimioterapia de inducción (Barlogie *et al.*, 2004). No obstante, se ha demostrado que los pacientes que se someten a estos tratamientos suelen responder bien inicialmente y más tarde suelen recaer ocasionando que

sea necesario aplicarles un nuevo tratamiento. Las recaídas son irremediables, por ello, a la hora de seleccionar un tratamiento se deben de emplear distintas terapias para intentar modificar la evolución de la enfermedad (Figura 1) (Hajek, 2013).



**Figura 1. Representación de la evolución del mieloma múltiple** (adaptado de Hajek, 2013).

Actualmente, solo reciben tratamientos los pacientes que presentan mieloma sintomático y, por tanto, muestran algunos de estos síntomas: enfermedad ósea, disfunción renal e hipercalcemia. Por un lado, se opta por el tratamiento de primera línea (1L) más común para aquellos pacientes que son candidatos a trasplantes; pacientes menores de 65 años sin comorbilidades significativas. Este tratamiento incluye quimioterapia de inducción con altas dosis de fármacos seguida de un trasplante de células madre autólogas hematopoyéticas. Con esta estrategia los pacientes pueden lograr una tasa de respuesta completa y mayor supervivencia. Hay una gran controversia con respecto a si el trasplante debe ser parte de la 1L o aplazarse hasta el momento de la recaída (Jasielec & Jakubowiak, 2013; Kyle & Rajkumar, 2009).

Por otro lado, antiguamente en pacientes que no eran aptos para trasplante se usaba la quimioterapia convencional, esta consistía en combinar Melfalán o Ciclofosfamida con Prednisona. Mientras que ahora lo que más se utiliza es Melfalán, Prednisona y Talidomida (MPT) o Melfalán, Prednisona y Bortezomib (VMP) (Jasielec & Jakubowiak, 2013). La mayor parte de los tratamientos con quimioterapia suelen emplear el fármaco Melfalán, ya que es uno de los agentes más efectivos (Smith *et al.*, 2006). Algunos expertos opinan que no es necesario combinarlo con otros productos citotóxicos, aunque se ha demostrado que combinar Melfalán mejora las tasas de respuesta, tiempo de progresión y supervivencia (San Miguel *et al.*, 2008). Aun así, la elección agente terapéutico o combinación de ellos depende de diversos factores como son la edad, la etapa de la enfermedad, factores pronóstico y las comorbilidades asociadas a su enfermedad (Smith *et al.*, 2006).

El tiempo de recaída es decisivo ya que en un período de recaída corto (< 6 meses) hace que la enfermedad se vuelva más agresiva. También, se opta por una segunda línea (2L) si el paciente presenta MM refractario, aparece cuando se está administrando un tratamiento activo y la enfermedad sigue progresando. Los pacientes se clasifican en pacientes refractarios primarios, cuando no logran una respuesta en la 1L, o pacientes refractarios secundarios, si no responden a tratamientos aplicados después de la recaída. Entonces, en la 2L el paciente puede volver a someterse a otro trasplante o recibir una combinación de fármacos diferente. La tercera línea (3L) y ulteriores, son idénticas a la 2L, van destinadas a pacientes que presentan una falta de

respuesta a tratamientos anteriores y se administran distintos cócteles de fármacos para poder alargar la supervivencia del paciente (Hajek, 2013; Kyle & Rajkumar, 2009).

## 1.2. Microambiente de la médula ósea.

La médula ósea (BM) se localiza en el interior de las cavidades centrales de los huesos axiales y largos. Está formada por islas de tejido hematopoyético y células adiposas rodeadas por senos vasculares dentro del hueso trabecular. El tejido hematopoyético se mantiene físicamente por la trabécula y el estroma de la BM. En este tejido, se localizan las células madre hematopoyéticas (HSCs), encargadas de producir las células que forman parte del sistema inmune y la sangre. Mientras que en el estroma de la médula ósea se encuentran las células madre mesenquimales (MSCs), responsables de la remodelación del hueso. Para que tenga lugar la hematopoyesis es necesario un microambiente, también denominado “nicho”, que pueda reconocer y retener las células madre hematopoyéticas y administrar los factores necesarios para la proliferación, diferenciación y maduración de las células madre en sus distintos linajes (Pittenger *et al.*, 1999; Travlos, 2006).

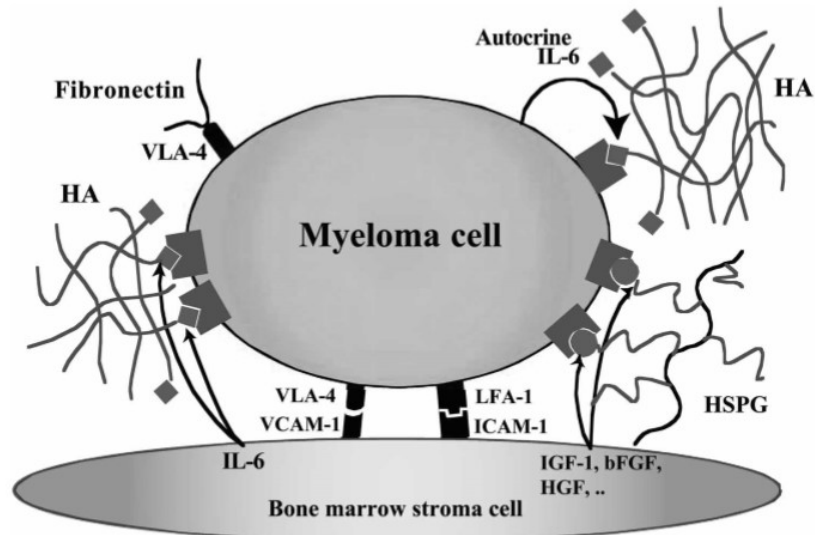
El microambiente de la médula ósea regula la diferenciación, migración, proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de las células plasmáticas malignas. Se compone de una matriz extracelular, formada por fibronectina (FN), colágeno de tipo I y IV, laminina, sulfato de condroitina y ácido hialurónico (HA), y diferentes poblaciones celulares: células endoteliales, linfocitos, MSCs, osteoblastos y osteoclastos.

La interacción del microentorno con las células del MM se produce a través de la expresión de moléculas de adhesión en su superficie, Tabla 1, como las integrinas  $\beta 1$ , el antígeno muy tardío 1 (VLA-1), el antígeno muy tardío 4 (VLA-4), la integrina  $\beta 2$  asociada al antígeno leucocitario funcional 1 (LFA-1/CD11a-CD18), el antígeno leucocitario funcional 3 (LFA-3/CD58), la molécula de adhesión celular neural (NCAM/CD56), sindecano-1 (CD138), el receptor de la motilidad mediada por HA (RHAMM) y CD44. La expresión de moléculas de adhesión no es constante, por lo que la interacción con el microentorno va cambiando según se desarrolla la enfermedad. (Manier *et al.*, 2012; Vincent & Mechti, 2005)

**Tabla 1. Receptores y ligandos claves en la resistencia a fármacos.** Esta tabla muestra los receptores y ligandos de las células plasmáticas malignas. En el caso los ligandos, pueden ser elementos de la matriz extracelular (ECM) o receptores de otras células presentes en el microambiente. VCAM-1, molécula de adhesión a células vasculares e ICAM-1: molécula de adhesión intercelular (adaptado de Vincent & Mechti, 2005).

Receptores de células del Mieloma Múltiple	Ligandos de los receptores
Integrina $\beta 1$	Fibronectina, laminina y VCAM-1
Sindecano-1	CD138
CD44	HA
RHAMM	HA
LFA-1/CD11a-CD18	ICAM-1
LFA-3/CD58	CD2
NCAM/CD56	NCAM/CD56

Las células del microambiente, generalmente MSCs, y la ECM interaccionan con las células del MM (Figura 2) e inducen la resistencia a fármacos llamada CAM-DR (resistencia a fármacos mediada por adhesión), en la cual se produce la activación de distintas rutas provocando el arresto del ciclo celular en fase G1, la producción de proteínas antiapoptóticas y la liberación de citoquinas y factores de crecimiento paracrinos y/o autocrinos.



**Figura 2. Interacciones involucradas en la resistencia a fármacos en el mieloma múltiple.** Las principales interacciones de las células tumorales son con otros tipos celulares, componentes de la ECM y factores de crecimiento y citoquinas solubles. Heparán sulfato (HSPG), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento básico para fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento básico para hepatocitos (HGF) (Vincent & Mechti, 2005).

Por un lado, **las células del microambiente** se unen a las células del MM estimulando su expansión y contribuyendo a la destrucción ósea.

Los osteoclastos y osteoblastos normalmente se encuentran en equilibrio y participan en el remodelado óseo. Sin embargo, en muchos casos de MM se pierde el equilibrio favoreciendo la activación de los osteoclastos e inhibiendo los osteoblastos. Esto se debe a que cuando las células del MM se unen a las MSCs, se produce un aumento de la expresión del activador del receptor del ligando NF- $\kappa$ B (RANK-L) que promueve, a través de la vía NF- $\kappa$ B y c-Jun-N-terminal (JNKs), la diferenciación de las células precursoras de los osteoclastos. De manera que se produce un aumento del proceso de resorción ósea que deriva en la destrucción del hueso. Aunque se inhiban los osteoblastos, pueden secretar interleucina-6 (IL-6), al estimularse con la interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), favoreciendo la proliferación de las células tumorales.

En el caso de las MSCs, secretan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e IL-6. Por tanto, la IL-6 al ser producida por MSCs y osteoblastos mejora, de forma paracrina, la estimulación de las células del MM produciendo la liberación de la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En conjunto, los factores de crecimiento y citocinas crean un bucle que mejora el crecimiento y supervivencia de las células plasmáticas malignas (Vincent & Mechti, 2005).

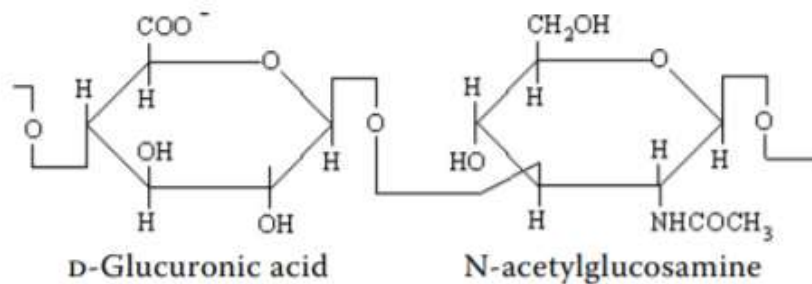
En las células tumorales, la IL-6 produce la activación de varias vías de señalización:

- RAS / RAF / MEK-ERK fomentan el crecimiento de las células del MM (McCubrey *et al.*, 2007).
- JAK / STAT3 favorece la supervivencia del tumor mediante la producción de las proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y Bcl-XL (Van de Donk *et al.*, 2005).
- PI3K / Akt inhibe los efectos antiploriferativos de p21 y p27, los cuales son inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CDK) (Hideshima *et al.*, 2001).

El VEGF es un factor proangiogénico que tiene un papel muy importante en la expansión del tumor. Las células del MM producen VEGF, el cual estimula la liberación, por parte de las MSCs, de IL-6 y VEGF. Así se fomenta la angiogénesis, donde la creación de nuevos vasos sanguíneos aumenta el suministro de oxígeno y nutrientes para mejorar la proliferación y migración de las células del MM (Giuliani *et al.*, 2011).

Por otro lado, cabe destacar que la **ECM** juega un papel muy importante en la patogénesis del MM. Ya que los componentes de la ECM son moléculas que promueven la resistencia de las células del MM a los fármacos. En este proyecto se optó por funcionalizar las microesferas con HA para proporcionar un entorno tridimensional similar a la médula ósea y poder estudiar su interacción con las células plasmáticas, porque se ha notificado que una elevada producción de HA en tejidos tumorales se correlaciona con la progresión tumoral, mientras que una interrupción de la interacción entre el HA y las células tumorales revierte la resistencia a distintos fármacos (Necas *et al.*, 2008).

EL HA se caracteriza por ser un biopolímero aniónico de alto peso molecular cuya estructura, altamente estable, está formada por repeticiones de disacáridos de ácido ( $\beta$ , 1-4)-D-glucurónico y ( $\beta$ , 1-4)-N-acetil-D-glucosamina (Figura 3). Se sintetiza naturalmente por unas proteínas integrales de membrana (hialuronansintasas) y se degrada por hialuronidasas.



**Figura 3. Estructura del ácido hialurónico.** Presenta disacáridos de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos entre sí a través de enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3 alternativos (Necas *et al.*, 2008).

En cuanto a las funciones biológicas, dado que es una molécula hidrofílica, controla la hidratación de los tejidos absorbiendo agua y mantiene las propiedades físicas llenando y organizando la ECM. También, tiene la capacidad de activar rutas de señalización intracelulares mediante receptores superficiales como CD44 y RHAMM. Además, en la BM el HA es una molécula crucial concentrando factores de crecimiento y citoquinas, se ha demostrado que protege, estabiliza y concentra la IL-6 en el medio de cultivo, cerca del punto de secreción, para promover la actividad autocrina de las células tumorales. Por tanto, al incluir este componente en el recubrimiento de las microesferas, las cuales interaccionan con las células tumorales, se favorecen unas condiciones *in vitro* parecidas a las que hay *in vivo* en la médula ósea.

En definitiva, es una molécula que participa en diversos procesos como el ensamblaje de la matriz, la embriogénesis, la proliferación celular, la migración celular, la diferenciación celular, la angiogénesis, inflamación y la metástasis tumoral (Necas *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2001; Vincent & Mechti, 2005).

### 1.3. Ingeniería tisular: Cultivos 3D vs Cultivos 2D.

A pesar de que se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos para tratar el MM, como son los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de quinasas, no consiguen destruir todas las células tumorales porque existen subclones que desarrollan resistencias a los fármacos debido, principalmente, a la interacción con el microambiente de la BM. Ello causa que los pacientes recaigan reiteradamente al someterse a distintas líneas de tratamientos. De ahí que el MM siga siendo incurable, por lo que existe la necesidad de crear modelos de cultivo tridimensionales (3D) que permitan estudiar ampliamente las resistencias y localicen nuevas dianas terapéuticas que sean efectivas.

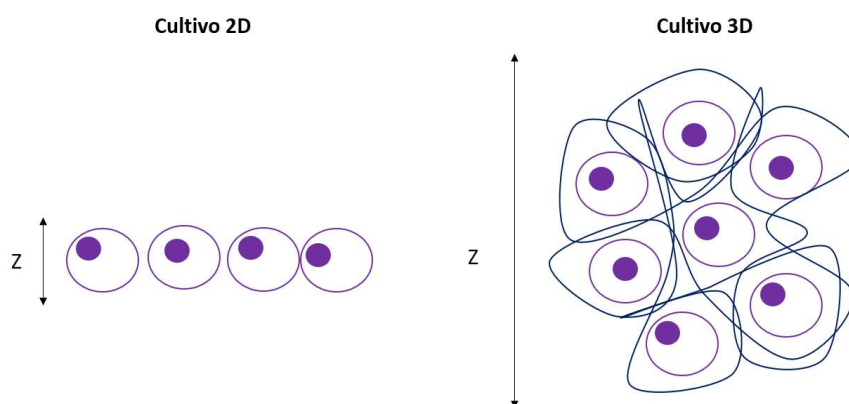
La ingeniería tisular es una técnica biomédica que supone la combinación de células y soportes para permitir la regeneración tisular. Sin embargo, se puede emplear con la finalidad de diseñar modelos de cultivo tridimensionales que se utilicen para investigar los mecanismos biológicos del MM y la resistencia a fármacos.

Los modelos clásicos de cultivo bidimensional (2D) han demostrado que no consiguen reproducir el microentorno de la médula ósea ya que posee una estructura tridimensional (De la Puente *et al.*, 2015; Narayanan *et al.*, 2014).

La elección del tipo de cultivo (Figura 4) que se va a establecer es importante ya que el entorno en el que se adaptan las células influye sobre la proliferación, diferenciación y función.

Al establecer un cultivo 2D las células crecen en sustratos planos, en consecuencia, su morfología y expresión genética se ven modificadas. Se produce un aplanamiento celular que provoca una remodelación de su citoesqueleto y diferencias en la expresión de genes y síntesis de proteínas. Por ello, un modelo de cultivo 2D no es adecuado a la hora de estudiar el crecimiento celular *in vitro*, ya que las células se comportan de forma diferente y no pueden producir organizaciones similares a los tejidos. Esto influye sobre los resultados de ensayos farmacológicos, por ejemplo, se cree que las monocapas de células cultivadas son más susceptibles a los agentes terapéuticos.

El cultivo celular 3D proporciona un microentorno más adecuado para el crecimiento y diferenciación celular. Al contar con una tercera dimensión fomenta la interacción celular y la transmisión de señales para crear estructuras más similares a los tejidos nativos, gracias a que permite una disposición organizada de receptores y moléculas de adhesión. Un cultivo 3D reduce el estrés y las respuestas artificiales que se dan en cultivos 2D por lo que las células mantienen su estructura, forma y función, ello puede ofrecer resultados más relevantes al realizar ensayos *in vitro*. En consecuencia, los modelos de cultivo 3D son herramientas con mucho potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos (Knight & Przyborski, 2015).



**Figura 4. Representación de un cultivo bidimensional y tridimensional.** La altura total (Z) en un cultivo 2D es constante, mientras que la de un cultivo 3D es más variable por lo que puede permitir la formación de múltiples capas de células.



En el diseño de cultivos 3D se emplean soportes que permitan la proliferación celular y mimeticen las condiciones del microambiente en el que normalmente viven las células. Para la fabricación de los soportes se han utilizado ampliamente polímeros como biomateriales.

Los polímeros son macromoléculas formados a partir del encadenamiento de unidades más pequeñas (monómeros) mediante enlaces covalentes. Se clasifican en polímeros naturales y sintéticos.

Los polímeros naturales pueden ser proteínas (seda, colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina, actina y miosina), polisacáridos (celulosa, amilosa, dextrano, quitina y glicosaminoglicanos) o polinucleóticos (ADN y ARN) (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Estos materiales presentan sus propias moléculas bioactivas y por ello, proporcionan mejores interacciones con las células. Sin embargo, son biodegradables, normalmente por hidrólisis enzimática, y presentan propiedades mecánicas limitadas. A la hora de obtener cultivos 3D los soportes no deben de deteriorarse y, además, deben de presentar unas propiedades mecánicas óptimas, ya que de lo contrario el comportamiento celular puede verse alterado (Knight & Przyborski, 2015).

Los polímeros sintéticos son muy útiles en el campo biomédico, ya que sus propiedades como la porosidad, el tiempo de degradación y características mecánicas se pueden ajustar para cada aplicación (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Pueden ser inertes y no degradables o diseñarse para que tengan la cinética de degradación adecuada a cada aplicación, seleccionando los polímeros o copolímeros convenientes. También, se pueden producir en grandes cantidades y almacenar durante largos períodos de tiempo a diferencia de los polímeros naturales. En contraste, son menos biocompatibles, no son bioactivos y pueden carecer de sitios para la adhesión celular, por lo que a veces se requiere un recubrimiento con proteínas de la ECM (Carletti *et al.*, 2011).

Los materiales poliméricos empleados en los cultivos 3D presentan distintas propiedades según su composición, estructura y disposición de sus macromoléculas constituyentes. En general para utilizar un material en un cultivo 3D se busca que: 1) Sea biocompatible, 2) Presente propiedades superficiales que promuevan la adhesión celular, la proliferación y la diferenciación, 3) Sea esterilizable y bioestable, 5) Posea un elevado ratio superficie/volumen y 6) Permita el transporte de gases, nutrientes y factores para la supervivencia celular, proliferación y diferenciación. Aun así, las características requeridas difieren según la aplicación. (Dhandayuthapani *et al.*, 2011; Knight & Przyborski, 2015).

No existe un modelo de cultivo 3D estándar para todos los tipos celulares, según el ensayo requerido se utiliza un sistema u otro. En cuanto a los soportes más utilizados destacan los hidrogeles, los soportes macroporosos o *scaffolds* y microesferas.

En primer lugar, los hidrogeles son materiales blandos compuestos por redes de polímeros tridimensionales insolubles y reticuladas que se caracterizan por absorber grandes cantidades de agua proporcionando un microambiente acuoso parecido al de la ECM. Además, dotan de una gran elasticidad, tenacidad y resistencia. Al ser materiales porosos permiten un transporte difusivo de nutrientes similar a los tejidos nativos (Ma *et al.*, 2016). En cuanto a su aplicación, los hidrogeles se utilizan comúnmente en cultivo 3D encapsulando las células en un microentorno de ECM artificial (Geckil *et al.*, 2010).

Por otro lado, los *scaffolds* son soportes en forma de esponjas con poros interconectados de tamaños superior al de las células, que permiten la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Pueden producir estructuras organizadas de células *in vitro* de manera controlable y reproducible. Hay una gran variedad de *scaffolds* con una amplia gama de propiedades que se fabrican mediante diferentes técnicas y materiales (Knight & Przyborski, 2015).

En cuanto a las microesferas, se pueden describir como partículas esféricas pequeñas comprendidas entre una y mil micras. Presentan una gran variedad de aplicaciones en diferentes áreas, por ejemplo, son ampliamente utilizadas en biomedicina como vehículos de administración de fármacos y proteínas o genes. Recientemente, se ha prestado atención al uso de microesferas para la regeneración de tejidos, como es el caso del empleo de micropartículas de quitosano inyectadas en *scaffolds* para trasplantes celulares (Cruz *et al.*, 2008).

Respecto a su aplicación en la tecnología de cultivos celulares, las microesferas también se utilizan como soportes para la proliferación y diferenciación celular permitiendo el modelaje y estudio de diversas enfermedades gracias a que pueden proporcionar un entorno 3D que mimetiza el ambiente *in vivo*.

#### **1.4. Polimerización en emulsión.**

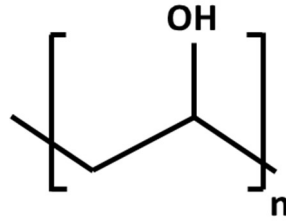
Existen diversas técnicas para producir microesferas: extracción/evaporación de disolventes, separación de fases (coacervación) y secado por pulverización (Kawaguchi, 2000). La técnica de fabricación de microesferas empleada en este trabajo final de grado es la polimerización por emulsión, la cual presenta varias ventajas sobre otras técnicas de polimerización; por ejemplo, permite una adecuada disipación del calor, hay un mayor control de la viscosidad y mantiene la uniformidad de la agitación (Marvel, 1963).

Las emulsiones se definen como dispersiones de una fase líquida en forma de gotas en otra fase líquida llamada fase continua, donde ambas fases son inmiscibles entre sí (Park *et al.*, 2003). Las emulsiones se pueden clasificar como simples y dobles. Dentro de las emulsiones simples destacamos, por su aplicación en este trabajo, el tipo O/W (aceite en agua), para la producción de microesferas, donde la fase continua es un líquido acuoso hidrófilo, mientras que la fase orgánica dispersa se compone de una disolución de un monómero o mezcla de monómeros. Para dispersar la fase orgánica en forma de gotas en la fase acuosa es necesario aplicar energía mecánica mediante ultrasonidos, burbujeo de aire, agitación mecánica etc.

Debido a la gran variedad de reactivos que se pueden emplear en estos sistemas, es necesario definir un sistema básico para comprender el mecanismo de la polimerización por emulsión. Este sistema se compone de un iniciador, un agente emulsificante (surfactante) y 2 fases inmiscibles; una fase orgánica y una fase acuosa.

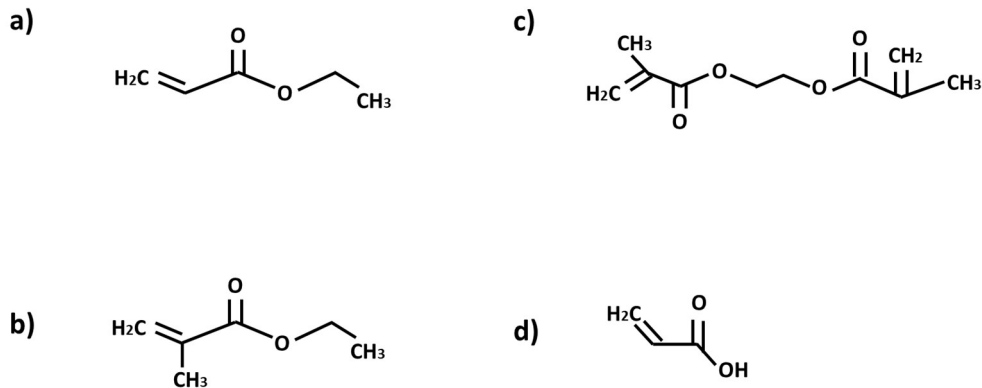
El surfactante disminuye la tensión interfacial proporcionando estabilidad a la emulsión y, en algunos casos, promoviendo sitios para la nucleación mediante la formación de micelas, esto último depende de la concentración y tipo de surfactante utilizado. La elección del surfactante depende de la naturaleza de los monómeros y, por tanto, del mecanismo de nucleación deseado. Los surfactantes más comunes son aniónicos donde predominan las sales de sodio o potasio y no iónicos como el poli(alcohol vinílico) (PVA) y poli(óxido de etileno) (Park *et al.*, 2003).

El PVA es un polímero sintético formado a partir de la hidrólisis del poli(vinil acetato). Presenta una estructura cristalina hidrófila (Figura 5) que le permite ser soluble en agua, resistente a aceites y disolventes y ejercer de agente emulsionante protector (Gaaz *et al.*, 2015). Además, es biocompatible y biodegradable, de ahí, que se utilice extensamente para la formación de hidrogeles que dotan de buenas propiedades mecánicas y químicas (Pal *et al.*, 2007).



**Figura 5. Estructura química del PVA.**

Los monómeros de la fase orgánica cuando entran en contacto con la fase acuosa pueden formar gotas en el agua, disolverse en el agua gracias a la solubilidad parcial de ciertos monómeros como el ácido acrílico, y localizarse en el interior de micelas producidas por surfactantes inmiscibles en agua. Entre los monómeros más utilizados se encuentran los acrilatos y metacrilatos (Figura 6) como el ácido acrílico (AA), acrilato de etilo (EA), dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) y metacrilato de etilo (EMA). Se emplean ampliamente en la ingeniería tisular para la fabricación de soportes ya que son inertes y su biodegradabilidad es controlable (Diego *et al.*, 2005; Syed *et al.*, 2018).

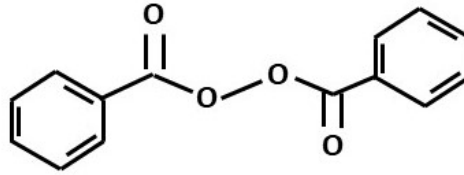


**Figura 6. Estructuras químicas del EA (a), EMA (b), EGDMA (c) y AA (d).**

Los acrilatos y metacrilatos polimerizan por adición, este tipo de polimerización empieza por la presencia de un iniciador que activa los monómeros rompiendo sus dobles o triples enlaces de carbono. De esta manera, los monómeros son inestables y se unen entre sí formando el polímero. Los iniciadores pueden ser: un radical (polimerización por radicales libres), catión (polimerización catiónica), anión (polimerización aniónica) o un complejo organometálico (polimerización por coordinación) (Laurence, 2017).

En la polimerización por radicales libres se dan las siguientes etapas (Chorng-Shyang, 2008):

- **Iniciación:** a través de un iniciador se forman radicales libres, normalmente por calentamiento o irradiación ultravioleta, y cada radical libre se une a una molécula de monómero.  
Hay una gran cantidad de iniciadores radicalarios que se pueden emplear solos o combinados, como los peróxidos, azonitrilos o hidroperóxidos. Uno de más utilizados es el peróxido de benzoilo (BPO), Figura 7, porque da mejores resultados proporcionando radicales (Marvel, 1963).



**Figura 7. Estructura química del BPO.**

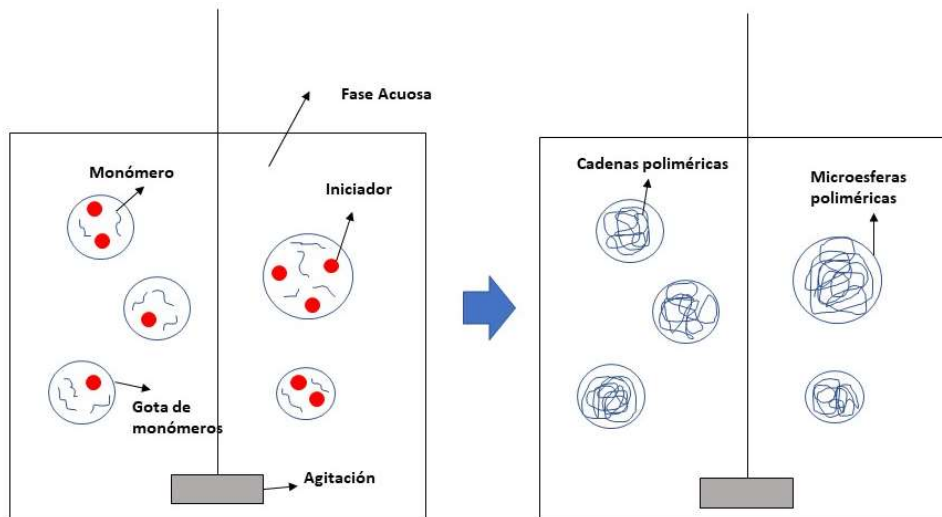
- **Propagación:** la cadena polimérica crece a medida que se unen las moléculas de monómero porque cada adición forma un nuevo radical que permite la unión de más unidades monoméricas.
- **Terminación:** la cadena de crecimiento polimérica deja de crecer por desactivación del radical libre. Se puede detener la reacción mediante recombinación de radicales, desproporción o agentes de transferencia.

Normalmente los acrilatos y metacrilatos destinados a la fabricación de biomateriales están inhibidos por agentes como la monometil éter hidroquinona (MEHQ) y la fenotiazina (PTZ). También, el oxígeno disuelto en la solución monomérica puede actuar como inhibidor o mejorar el efecto de la MEHQ. En contraste, el PTZ no se ve afectado por la presencia de oxígeno, lo cual hace que sea un inhibidor más potente. En los inhibidores sirven para evitar polimerizaciones espontáneas y, además, se ha comprobado que el uso de inhibidores no afecta la conversión monomérica y el peso molecular promedio del polímero (Li & Schork, 2006).

En base al sistema anteriormente descrito se pueden dar diferentes mecanismos de polimerización por emulsión: nucleación micelar, nucleación homogénea y nucleación coagulativa (Chorng-Shyan, 2008). Estos tres mecanismos también se pueden combinar entre sí para obtener distintos tipos de microesferas.

La nucleación micelar fue postulada por Harkins (1945) para desentrañar el funcionamiento de la polimerización por emulsión. En este mecanismo las partículas de polímero se forman cuando radicales producidos en la fase acuosa, a través de un iniciador soluble en agua, viajan al interior de micelas de surfactante hinchadas con gotas de monómeros en su interior. También se produce cuando el iniciador es soluble en la fase orgánica. La nucleación homogénea, propuesta por Roe (1968), sucede de una manera similar a la nucleación micelar, pero se diferencia en que los surfactantes no forman micelas. Por tanto, los radicales se adsorben al surfactante y monómeros para producir y estabilizar las partículas poliméricas. Más tarde, a partir de este último modelo, se desarrolló la nucleación coagulativa, la cual propone que las partículas poliméricas son originadas por la coagulación de partículas precursoras creadas por la nucleación homogénea y nucleación micelar (Bradley R *et al.*, 1992).

En este proyecto, la fabricación de las microesferas se da por un mecanismo de nucleación homogénea, donde los monómeros disueltos en la fase orgánica forman gotas en la fase acuosa y se transforman en partículas poliméricas por acción del iniciador BPO presente en las gotas monoméricas (Figura 8).



**Figura 8. Proceso de nucleación homogénea en una emulsión O/W.**

Por último, cabe destacar que la obtención de microesferas mediante esta técnica es compleja, ya que intervienen diferentes reactivos que pueden dar resultados muy distintos según su aplicación. Además, los parámetros del proceso (velocidad de agitación, concentración de tensioactivos y volumen de la fase acuosa) se han de regular adecuadamente para controlar el diámetro de las microesferas (Kawaguchi, 2000).

### **1.5. Funcionalización y modelos de médula ósea actuales.**

Normalmente los soportes utilizados en ingeniería tisular se pueden funcionalizar para que sean bioactivos y, por tanto, adquieran nuevas propiedades que les permitan ser capaces de interactuar específicamente con sistemas biológicos.

Hay dos estrategias comúnmente usadas para modificar las superficies de los biomateriales: 1) Añadir grupos funcionales en los monómeros, los cuales antes del proceso de polimerización se pueden encontrar protegidos para después exponerse en la superficie y 2) Incorporar grupos funcionales modificando la superficie de polímeros (Tian H *et al.*, 2012).

La modificación de la superficie de los biomateriales se puede realizar mediante diversas técnicas como la adsorción y autoensamblaje de proteínas o transformaciones covalentes directas a la superficie. La elección de la técnica de funcionalización depende de las propiedades químicas de la biomolécula que se quiere inmovilizar. Además, es importante mantener las características generales del material alterando solo la especificidad y reconocimiento de la superficie (Sanghvi *et al.*, 2005).

Uno de los usos que presenta la funcionalización de biomateriales es incorporar componentes de la ECM en la superficie de soportes para mimetizar *in vitro* el entorno celular. En el caso del MM se busca reproducir el nicho tumoral para analizar el comportamiento de las células en términos de resistencia a fármacos y elaborar así plataformas de cultivos que permitan avanzar hacia el tratamiento personalizado. Para ello, se han diseñado diferentes modelos de médula ósea que se componen de soportes y células para imitar el nicho del mieloma. Recientemente, han propuesto un modelo muy prometedor para estudiar los mecanismos de resistencia del mieloma y testear fármacos experimentales, además, de evaluar su eficacia en distintos pacientes de manera individualizada. Este modelo es un co-cultivo *ex vivo* 3D formado por células estromales multipotentes y células de MM del paciente en un hidrogel (Jakubikova *et al.*, 2016).

## 2. OBJETIVOS

Este estudio se enmarca en el proyecto PROMETEO/2016/063 que busca alcanzar un modelo de médula ósea artificial con la finalidad de personalizar el tratamiento de pacientes de cánceres de sangre, mediante un medio de cultivo tridimensional (3D), para poder cultivar las células de cada paciente de mieloma múltiple proporcionando un medio artificial que simule las mismas resistencias a fármacos que se generan *in vivo*, de forma que se pruebe en los laboratorios la eficacia de los tratamientos que están disponibles antes de aplicárselos al paciente. Los cultivos 3D que se están desarrollando constan de microesferas funcionalizadas con biomoléculas en la médula ósea.

Para ello, en este Trabajo Final de Grado se han establecido los siguientes objetivos concretos:

1. Puesta a punto del procedimiento de fabricación de las microesferas poliméricas y caracterización.
2. Obtención de HA de bajo peso molecular.
3. Funcionalización de la superficie de las microesferas por injerto del HA mediante enlaces covalentes y caracterización de las microesferas funcionalizadas.
4. Caracterización de la línea celular U266 mediante citometría de flujo.
5. Evaluación de la viabilidad y proliferación celular en cultivos 3D de la línea U266 en el entorno creado con este material soporte mediante, respectivamente, un ensayo LIVE/DEAD y un ensayo de cuantificación del DNA.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales y reactivos.

En la producción de microesferas se utilizó poli(vinil alcohol) (Sigma-Aldrich) al 4% w/v en H<sub>2</sub>O, acrilato de etilo (EA) (Sigma-Aldrich), metacrilato de etilo (EMA) (Sigma-Aldrich), dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) (Sigma-Aldrich), ácido acrílico (AA) (Sigma-Aldrich), peróxido de benzoílo (BPO) (Fluka), NaOH al 5% w/v en H<sub>2</sub>O (Scharlab) y NaCl al 10% w/v en H<sub>2</sub>O (Scharlab). En los lavados de las microesferas se empleó NaCl al 5% w/v en H<sub>2</sub>O, acetona (Scharlab) y H<sub>2</sub>O. Para la selección de tamaños de las microesferas se utilizaron tamices celulares de 40 µm (VWR).

En la funcionalización de microesferas se obtuvo HA de bajo peso molecular degradando HA de elevado peso molecular (*HA sodium salt from Streptococcus Equi*, Sigma-Aldrich). Para ello se utilizó una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich). En la activación de los grupos carboxilos del AA y del HA se empleó una disolución de hidrocloruro-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich) combinada con N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich) en DPBS (Sigma). Después, se utilizó una disolución de polietilenglicol diamina (PEG-di-NH<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich) en buffer fosfato salino (DPBS) (Sigma). Para lavar las microesferas se utilizó ácido cítrico (Sigma-Aldrich) y Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,1% w/v. A continuación, se inactivaron los grupos carboxilo del AA con una disolución de etanolamina (Sigma) en DPBS. Por último, en la cuantificación de grupos carboxilos se utilizó azul de toluidina O (TBO) (Sigma-Aldrich) y ácido acético (Scharlab). Las microesferas con y sin HA se esterilizaron con etanol (EtOH) (Scharlab) al 70% y DPBS estéril.

En cuanto a los cultivos celulares se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), suero fetal bovino (FBS) (Fisher), medio básico RPMI 1640 (Sigma), Penicilina/Estreptomina (Lonza), L-glutamina (Lonza), flascos T-25 (VWR) y placas multipocillo de poliestireno P24 no tratadas (VWR). Para el ensayo del LIVE/DEAD se utilizó un kit comercial (Live/Dead cell Viability/Citotoxicity kit for mammalian cells L3224, Invitrogen) y DPBS estéril. Mientras que en el ensayo de cuantificación del DNA se empleó el kit Quant-iT PicoGreen™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific), placas de fluorimetría Optiplat Black p96 (Perkin Elmer), tripsina (Sigma), proteinasa K (Roche), hialuronidasa (Sigma), tris (Nzytech), tritón (Sigma-Aldrich) y EDTA (Sigma-Aldrich). Por último, para caracterizar la línea celular U226 se utilizaron anticuerpos monoclonales intracelulares (Becton Dickinson), 2 reactivos para fijar y permeabilizar las células (Becton Dickinson).

## 3.2. Obtención y caracterización de los materiales.

### 3.2.1 Microesferas poliméricas.

#### 3.2.1.1. Obtención de microesferas poliméricas de acrilatos y ácido acrílico.

Las microesferas de copolímeros de EA, EMA, EGDMA y AA se han producido a través del método de polimerización por emulsión. Durante el proceso de obtención de microesferas se trabajó en vitrinas de extracción con ozono y fue necesario el uso de guantes de laboratorio y máscaras con filtros. También se gestionaron adecuadamente los residuos de monómeros y polímeros.

En la polimerización por emulsión se utilizó una fase acuosa de poli(vinil alcohol) (PVA) al 4% w/v en H<sub>2</sub>O como fase continua y una fase orgánica compuesta por una disolución de monómeros (EA, EMA, EGDMA y AA).

Primeramente, se acondicionó la fase acuosa, para ello se tamizaron 100 mL de PVA al 4% w/v en H<sub>2</sub>O y se depositaron en un matraz aforado de 500 mL. Después, como se puede observar en la Figura 9, el matraz se colocó en un agitador magnético (J.P. Selecta, España) dentro de la camisa de un baño de recirculación (Heidolph, Alemania) y se estabilizó la emulsión con una agitación de 800 rpm a 30°C durante 30 min. Mientras se estabilizaba la fase acuosa se procedió a la preparación de la fase orgánica, para ello se añadió un 50% de EA, 30% de EMA y 10% de EGDMA en un frasco de 50 mL con un agitador magnético. Luego, para eliminar el inhibidor (hidroquinona), el cual impide la polimerización de los monómeros, se depositó NaOH al 5% w/v en H<sub>2</sub>O dentro del recipiente y se agitó durante 5 min.



**Figura 9. Montaje experimental empleado en la fabricación de microesferas.**

Al terminar la agitación, se produjo la separación de las fases; en la fase superior se localizan los monómeros sin inhibidor y en la fase inferior la sosa con el inhibidor. Entonces, se retiraron 9,62 mL de la fase superior, se depositaron en un frasco de 25 mL y se añadió el AA y un 0,5% de iniciador BPO. Al tratarse de una polimerización radicalaria es importante la adición del iniciador



BPO ya que por acción de la temperatura se encarga de romper los dobles enlaces de los monómeros permitiendo la síntesis del polímero.

Una vez se añadió el iniciador, la mezcla se agitó manualmente 1 min para disolver el iniciador. Seguidamente, cuando la fase acuosa se estabilizó se generó la emulsión. Para ello, se abrió el matraz aforado, se colocó un embudo de vidrio y se vertió la disolución de monómeros. La emulsión se dejó estabilizar durante 10 min y después se aumentó la temperatura del baño a 65°C. Cuando el baño alcanzó esa temperatura se mantuvo la polimerización 6 h y se controló el proceso cada 30 min para que el baño de recirculación no se detuviese por evaporación del agua.

Al finalizar la polimerización, se realizó un paso de post-polimerización con el objetivo de que las microesferas terminasen de polimerizar. Para ello, 30 min antes de la finalización de la polimerización se introdujo un vaso de precipitados, NaCl al 10% w/v en H<sub>2</sub>O y agua del baño de recirculación en una estufa a 80°C. Una vez acabó la polimerización, se transfirió la emulsión al vaso de precipitados y se añadieron 110 mL de NaCl al 10% w/v en H<sub>2</sub>O que sirvió para aumentar la fuerza iónica y evitar la agregación de las microesferas. Después, se colocó el vaso de precipitados en el interior de la camisa del baño, se redujo la agitación a 625 rpms y se aumentó la temperatura del baño a 90°C. Al alcanzar la temperatura deseada la post-polimerización permaneció en agitación durante 1 h. Transcurrido ese período de tiempo se apagó el baño y se estableció una agitación suave de 250 rpms durante toda la noche.

Una vez se obtuvieron las microesferas se realizaron lavados para eliminar los restos de monómeros y suciedad. Por tanto, se colocaron las microesferas en *falcons* de 50 mL y se centrifugaron 5 min a 5000 rpms. Después se realizaron los lavados, donde en cada uno se eliminó el sobrenadante tras centrifugar 3 min a 5000 rpms; se hizo 1 lavado con NaCl al 5% w/v en H<sub>2</sub>O, 1 lavado con H<sub>2</sub>O, 3 lavados de 24 h con acetona en agitación y 2 lavados con H<sub>2</sub>O para eliminar el olor de la acetona.

### **3.2.1.2. Caracterización morfológica de las microesferas mediante microscopia electrónica de barrido.**

Las microesferas fueron visualizadas mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Ultra 55 (Zeiss Auriga Compact, Alemania) para la caracterización morfológica. Para ello, las muestras se recubrieron con platino, el cual es un material conductor que permite la observación de la superficie de las microesferas en el microscopio, en vacío a través de un equipo de recubrimiento por bombardeo iónico JFC 1100 (JEOL, Japón).

Las imágenes obtenidas fueron realizadas a 1kV en distintos aumentos: 100x a fin de poseer una visión general, 200x y 1000x para el conteo de microesferas y 2000x con la finalidad de conseguir una mayor información sobre la topografía de la superficie de las microesferas.

### **3.2.1.3 Caracterización del AA en las microesferas con FT-IR.**

La técnica de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) combinada con la Reflectancia Total Atenuada (ATR) permite averiguar los grupos funcionales que presenta una determinada muestra. Funciona haciendo pasar un haz de radiación infrarroja (IR) a través de un cristal en el que se deposita una muestra. En consecuencia, una parte del haz IR atraviesa la muestra y la otra parte se absorbe por la muestra. El detector recoge la transmitancia, es decir, el haz de IR que atraviesa la muestra, y, mediante la transformada de Fourier se crea un espectro con patrones de bandas característicos de las moléculas de la muestra analizada. De manera que se utilizó esta técnica para comprobar que las microesferas habían incorporado AA en su superficie después de la polimerización.

En primer lugar, se prepararon 30 mg de microesferas funcionalizadas y sin funcionalizar. Después se desecaron mediante ciclos extracción continua en un desecador (J.P.Selecta, España) y se analizaron las muestras con el equipo SpectrumTwo (Perkin Elmer, Estados Unidos).

### **3.2.1.4. Distribución de tamaños de las microesferas.**

Las imágenes tomadas con FESEM Ultra 55 (Zeiss Auriga Compact, Alemania) se analizaron mediante el programa ImageJ (*National Institutes of Health*, Estados Unidos) para obtener la distribución de tamaños de las microesferas y poder comprobar que poseían un tamaño adecuado. Esto se realizó calibrando las imágenes con la opción *Analyze/Set Scale* y midiendo el diámetro de 600 esferas obtenidas en dos síntesis.

## **3.2.2 Microesferas poliméricas con HA.**

### **3.2.2.1 Funcionalización de las microesferas poliméricas.**

Primeramente, las microesferas se tamizaron con filtros celulares de 40  $\mu\text{m}$  para eliminar las microesferas más grandes. Al obtener la cantidad deseada de microesferas tamizadas, se funcionalizaron con HA mediante un método basado en la química de la carbodimida o hidrocloreuro-3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC), para activar los grupos carboxilo del AA localizados en la superficie de las microesferas, permitiendo el acople de aminas primas mediante una molécula puente que conlleve a la formación de enlaces amida con el HA. También, es necesario utilizar la N-hidroxisuccinimida (NHS) combinada con la EDC para aumentar la eficacia del agente activante y estabilizar la reacción.

Para realizar la funcionalización se requirió una concentración de HA del 5% w/w, al disponer de un HA comercial de alto peso molecular ( $1,5-1,8 \cdot 10^6$  Da), cuya viscosidad impide preparar disoluciones de la concentración deseada, se tuvo que degradar para poder obtener de un HA de bajo peso molecular. Para ello, se preparó una disolución de 1000 mg de HA de alto peso molecular en 100 mL de agua mQ pH 0,5. Esta disolución se mantuvo en agitación (200 rpm) en una estufa 37 °C durante 24 h (Memmert, Alemania) para degradar el HA. Pasado el tiempo de degradación, se ajustó el pH a 7 añadiendo NaOH y se introdujo la disolución en una membrana

de diálisis de celulosa de 3500 MWCO en H<sub>2</sub>O, donde se realizaron cambios de H<sub>2</sub>O 3 veces al día. Por último, el HA se congeló a -80 °C (NuAire, Estados Unidos) durante 2 h y después se liofilizó (TELSTAR, España) durante 4 días.

Una vez se obtuvo el HA de bajo peso molecular se procedió a la pre-activación de los grupos carboxilo dispuestos en la superficie de las microesferas. Primero, se introdujeron las muestras en un baño de ultrasonidos (VWR, Estados Unidos) durante 5 min con el fin de facilitar su homogenización. Después, se incubaron las microesferas con una disolución, de EDC a 10 mg/mL combinada con NHS a 1 mg/mL en DPBS a pH 7,4 durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Al finalizar la incubación, se realizaron 2 lavados con H<sub>2</sub>O. Seguidamente, se añadió un puente de polietilenglicol diamina (PEG-di-NH<sub>2</sub>) a los grupos carboxilo, previamente activados, para poder disponer de grupos amina que permitiesen la unión de moléculas de HA mediante la creación del enlace covalente tipo amida. Por ello, se añadió una disolución de PEG-di-NH<sub>2</sub> (PEO) 20 mM en DPBS a las microesferas y se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 h. A continuación, las microesferas se lavaron 3 veces con DPBS.

Una vez añadido el puente se injertó el HA, por tanto, fue necesario activar los grupos carboxilo terminales de las moléculas de HA de bajo peso molecular para que fuera posible formar el enlace amida. Para ello, se preparó una disolución de HA de bajo peso molecular al 5 % w/v en DPBS con EDC y NHS a 10 y 1 mg/mL respectivamente y se incubó 2 h a temperatura ambiente en agitación. Cuando se pre-activó el HA de bajo peso molecular se incubó con las microesferas durante 24 h a 37°C en una estufa. Después, se realizaron 2 lavados de ácido cítrico 0,5 M y Tritón X-100 al 0,1% w/v con 5 min de agitación, y 2 lavados de H<sub>2</sub>O con 10 min de agitación.

Finalmente, para evitar interacciones no deseadas se inactivaron los grupos carboxilo del AA que no habían conseguido reaccionar. De modo que las microesferas se incubaron con una disolución de 1 M de etanolamina en DPBS a pH 9 durante 1 h a 4 °C agitando. Al terminar la incubación, se eliminó la etanolamina y se llevaron a cabo 3 lavados con H<sub>2</sub>O agitando 10 min en cada lavado.

### **3.2.2.2 Caracterización de la funcionalización de las microesferas con TBO.**

El ensayo mediante azul de toluidina O (TBO) se ha empleado para controlar la calidad y cuantificación de grupos carboxilos en la superficie de microesferas con un 10% de AA, microesferas con un 0% de AA, microesferas con un puente PEO y microesferas funcionalizadas con HA.

En primer lugar, se tomaron alícuotas de 40 mg de los cuatro tipos de microesferas y se incubaron con una disolución de TBO 500 µM a pH 10 en agitación durante 3 h. Así, el colorante azul de toluidina O interacciona con los carboxilos y se une específicamente a ellos. Una vez terminada la incubación se realizaron 5 lavados con agua a pH 10 para eliminar el colorante inespecífico. Después, se transfirieron las microesferas a una disolución con ácido acético al 50% v/v durante 30 min. De esta manera, se produce un cambio en el pH para provocar que el

colorante azul de toluidina O deje de tener afinidad por los grupos carboxilos y se encuentre libre en la disolución de ácido acético. Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se prepararon estándares de concentración conocida de HA de bajo peso molecular en ácido acético al 50 % v/v para obtener una curva de calibrado y poder conocer la concentración de los grupos carboxilos de cada muestra. En último lugar, los patrones y las muestras se midieron en un espectrofotómetro Cary UV-VIS (Agilent Technologies, España) a la longitud de onda de absorción del TBO, 633 nm. Los resultados se procesaron con el *software* GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos) para realizar el análisis estadístico. Se realizó un Test de Friedman con comparaciones con comparaciones múltiples (test de Dunn's) entre las medias de todas las réplicas del análisis.

### **3.3. Cultivos celulares.**

En el cultivo 3D *in vitro* se utilizó la línea celular U266. En cuanto a las características que presenta, cabe destacar que es una línea celular continua de linfocitos B obtenidos a partir de sangre periférica de humano y, además, su crecimiento se da en suspensión.

Las células U266 utilizadas se encontraban congeladas en un criovial que contenía 1 mL de medio de congelación (10% de DMSO y 90% de FBS). Para descongelar y expandir las células se empleó medio de cultivo completo compuesto por medio básico RPMI 1640 suplementado con un 0,5% de Penicilina/Estreptomicina, 0,5% de L-glutamina y 15% de FBS. El cultivo se realizó en flascos T-25 y se utilizó la cámara Neubauer para conocer la densidad celular necesaria para establecer los distintos tipos de cultivo en placas P24 no tratadas.

#### **3.3.1 Caracterización de la línea celular U266**

Antes de realizar la siembra las células se caracterizaron por citometría de flujo FACSCanto-II (Becton Dickinson, Estados Unidos) para verificar la expresión de los marcadores superficiales e intracelulares propios de la línea celular U266.

La citometría de flujo permite obtener información de poblaciones celulares mediante una muestra que tenga un número elevado de células y sea representativa sobre el conjunto poblacional. Caracterizar las células permite detectar contaminaciones, expresiones de marcadores asociados con malignidad, una mala identificación de la línea celular, especie de origen, etc.

Primeramente, se prepararon dos alícuotas de células; una para analizar los marcadores superficiales y otra para los marcadores intracelulares. Ambas alícuotas se lavaron con PBS centrifugando a 300 g durante 5 min. Por un lado, en el protocolo de superficie, cuando la muestra estaba limpia de restos celulares, se añadieron los anticuerpos monoclonales de superficie, en la cantidad indicada en la Tabla 2 y, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Por otro lado, en el protocolo intracelular, al terminar el lavado de la alícuota se añadieron 100  $\mu$ L de reactivo para fijar las células y mantenerlas estables en el análisis, y se procedió a incubar durante 15 min en oscuridad. Después, se realizaron 2 lavados

con PBS, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de un reactivo permeabilizador para incorporar los anticuerpos monoclonales intracelulares (Tabla 2) y las células se incubaron durante 15 min en oscuridad. Por último, ambas alícuotas se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron por citometría de flujo.

**Tabla 2. Marcadores superficiales e intracelulares analizados para la caracterización de la línea celular U266.** En la primera fila se indica el fluorocromo conjugado con cada anticuerpo, la segunda fila se corresponde con el antígeno detectado por el anticuerpo y la tercera fila recoge la cantidad añadida de cada anticuerpo en el protocolo de marcaje descrito anteriormente.

Marcadores Superficiales						Marcadores intracelulares	
HV450	HV500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81
5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$

### 3.3.2 Obtención del cultivo 3D.

El objetivo principal de este estudio es desarrollar un cultivo 3D para comprobar la viabilidad y proliferación celular mediante dos ensayos: LIVE/DEAD y cuantificación del DNA celular. De modo que se preparó 1 placa P24 no tratada para cada tiempo (0,2,4 y 6 días) con 3 condiciones: 1) suspensión celular sin microesferas (SUSP), 2) células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y 3) células con microesferas funcionalizadas con HA (MGEL-HA).

Antes de realizar la siembra del cultivo celular se esterilizaron las microesferas para las condiciones de MGEL-CTRL y MGEL-HA en una cabina de flujo laminar (TELSTAR, España) con 3 lavados de EtOH al 70% seguidos de 3 lavados de DPBS estéril.

En todas las placas, los pocillos de cada condición contenían un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ . De esta manera, la condición SUSP contaba con 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 100.000 células, la condición MGEL-CTRL presentaba 75  $\mu\text{L}$  de microesferas sin funcionalizar y 425  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con 100.000 células y, por último, la condición de MGEL-HA tenía 75  $\mu\text{L}$  de microesferas funcionalizadas con HA y 425  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con 100.000 células. Además, para cada condición se realizaron 4 réplicas destinadas al ensayo de cuantificación del DNA y 1 réplica para el LIVE/DEAD.

La siembra de los cultivos celulares se realizó manteniendo unas condiciones óptimas de esterilidad mediante el uso de cabinas de flujo laminar. Al terminar la siembra, se incubaron las placas P24 a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> (New Brunswick Galaxy 170S, Eppendorf, España) en un agitador de placas multipocillo (VWR, España) a 300 rpm según cada tiempo de cultivo. El cambio de medio de cultivo de las placas se realizó cada 24 h. Para ello, primero se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo completo en cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en agitación durante 15 min. Después, se apagó la agitación durante 1 h para que las células y/o

microesferas precipitasen en el fondo del pocillo y no se perdieran al quitar, finalmente, 600  $\mu$ L de medio de cultivo.

### **3.3.3 Ensayo de la viabilidad celular mediante LIVE/DEAD.**

En la realización de este tipo de cultivos 3D es necesario verificar si los materiales son biocompatibles con las células ya que es importante conocer si las microesferas presentan citotoxicidad porque implicaría que no pueden ser utilizadas para futuros ensayos celulares. Para ello, se utilizó un kit comercial que mediante 2 fluorocromos (*ethidium-homidimer1* y *calcein-AM*) puede discriminar la población de células vivas y muertas. La *calcein-AM* permite identificar las células vivas debido a que tiñe las células de verde cuando la calceína es metabolizada por la actividad esterasa intracelular. Mientras que el *ethidium-homidimer1* solo tiñe de color rojo aquellas células que presentan la membrana celular dañada, por tanto, puede detectar las células muertas. Con la combinación de ambos fluorocromos se consigue un kit de detección muy eficaz para determinar la citotoxicidad de los materiales.

En las placas se analizó 1 réplica de cada condición, para ello se transfirieron 500  $\mu$ L de cada pocillo a *eppendorfs*. El medio de cultivo donde se encuentran las microesferas y/o células se ha de eliminar ya que contiene desechos celulares que pueden interferir en el ensayo, como es el caso restos de esterasas que interaccionan con la calceína produciendo fluorescencia inespecífica. Por lo que los *eppendorfs* se centrifugaron a 2000 rpms durante 5 min, quitando el medio de cultivo eliminando el sobrenadante. Seguidamente, para asegurar la correcta eliminación de los restos de esterasas se lavaron los *eppendorfs* con 1 mL de DPBS estéril atemperado a 37 °C, se centrifugó a 2000 rpms durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Después, se resuspendió el pellet de cada *eppendorf* con 300  $\mu$ L de mezcla del mix de revelado compuesto por 1496  $\mu$ L DPBS, 0,75  $\mu$ L de *calcein-AM* y 3  $\mu$ L de *ethidium-homidimer1*. El contenido de cada *eppendorf* se transfirió a un pocillo de una nueva placa P24 no tratada y esta se incubó 30 min a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en agitación y con oscuridad dada la fotosensibilidad de los fluorocromos. Al terminar la incubación se procedió a la toma de imágenes con un microscopio de fluorescencia (DMI3000b, Leica Microsystems, Alemania). Las longitudes de onda de excitación de los fluorocromos fueron 482 nm para la calceína y 528 nm para el bromuro de etidio respectivamente. Posteriormente, para determinar la viabilidad celular se hizo un recuento celular de las imágenes obtenidas de cada placa mediante la ayuda del software ImageJ.

### 3.3.4 Ensayo de la proliferación celular.

Con la finalidad de medir la evolución de la proliferación celular a distintos tiempos se utilizó el kit Quant-iT PicoGreen™ dsDNA el cual se compone de un fluoróforo que emite fluorescencia al unirse a dsDNA desnaturalizado. Mediante este kit se cuantificaron 4 réplicas de cada condición (SUSP, MGEL-CTRL y MGEL-HA) en los tiempos 0, 2, 4 y 6 días. Primeramente, para cada tiempo se transfirió el contenido de la placa, 500  $\mu\text{L}$ , a *ependorfs*. Además, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo atemperado a 37 °C a los pocillos, previamente vaciados, y se pasaron a los *ependorfs* con el objetivo de evitar que se quedaran células pegadas en el fondo de la placa. Por lo que el volumen final de cada *ependorf* era de 700  $\mu\text{L}$ . También, para asegurarse de que no se perdían células en la placa se tripsinizaron los fondos de los pocillos. De modo que se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tripsina por pocillo y se metió la placa en el incubador a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 10 min. Después, se bloqueó la tripsina con 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y se pasó el contenido del pocillo a *ependorfs*. Ambos tipos de *ependorfs* se centrifugaron a 2000 rpms 5 min y se retiró el sobrenadante. A continuación, se resuspendió, el pellet en 1 mL de DPBS atemperado a 37 °C, se centrifugó 2000 rpms 5 min y se quitó, con extremo cuidado, el sobrenadante para proceder a congelar directamente las muestras a -80 °C.

Una vez se obtuvieron todas las muestras se descongelaron en la nevera a 4°C, se mezcló el contenido de ambos tipos de *ependorfs* para cada condición y se lisaron las células para extraer el DNA con 150  $\mu\text{L}$  de una disolución de proteinasa K a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y DPBS a pH 8. A continuación, se calentaron las muestras a la temperatura óptima de la enzima, 60°C, durante 16 h y después se inactivó la enzima 10 min a 90 °C para parar la digestión enzimática. Cuando se detuvo la reacción se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugaron a 2000 rpms 5 min para separar el DNA de los restos celulares, ya que este se encontraba soluble en el DPBS. También se prepararon 6 estándares de DNA para disponer de una curva de calibrado. Finalmente, se cargaron 30  $\mu\text{L}$  de las muestras y estándares en una placa optiplate p96 y 170  $\mu\text{L}$  de una disolución de PicoGreen 1:485 en TE 1x, y se leyó la fluorescencia a 520 nm utilizando el equipo VictorR<sup>3</sup> (Perkin Elmer, Estados Unidos). En algunas muestras, antes de cargarlas en la placa, fue necesario realizar diluciones para evitar saturaciones de la señal de absorbancia. Los resultados fueron procesados para obtener el número total de células, para ello se utilizó como referencia que cada célula humana tumoral contiene 6 pg de DNA genómico (Speicher & Pantel, 2014). Una vez se obtuvo el número de células de cada muestra los resultados fueron gestionados con el *software* GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos) para realizar el análisis estadístico. Se realizó un ANOVA-two way con comparaciones con comparaciones múltiples (test de Tuckey) entre las medias de todas las réplicas del análisis, con un intervalo de confianza del 95%.

Después de analizar las muestras se propuso otro ensayo de cuantificación de DNA que se diferenciaba del anterior debido a que se emplearon distintos métodos de digestión para comprobar que el DNA se había liberado correctamente de las células. Para ello, se

homogeneizaron las muestras que contenían una disolución de proteinasa K 50 µg/mL y DPBS pH 8 y se mezclaron 100 µL de cada muestra con 100 µL de los nuevos sistemas de digestión celular que se pretendían testar. Por un lado, se empleó el detergente Tris/Tritón x 100/ EDTA (0,5mM tris pH 8, 0,5% tritón, 100% EDTA) incubando las muestras durante 70 min en agitación a 4°C. Por otro lado, se utilizó la Hialuronidasa 25 U/mL durante 3 h a 37 °C en agitación. Al realizar las digestiones se analizaron las muestras con el protocolo de cuantificación de DNA anteriormente descrito.

### **3.3.5 Cultivos celulares alternativos**

Debido a los resultados obtenidos tras la realización del primer cultivo, se plantearon diversas hipótesis. Con el objetivo de responder a las cuestiones que surgieron, se realizó otro cultivo celular, concretamente se planteó la necesidad de verificar si en el cambio de medio de la condición SUSP se estaban perdiendo células. De manera que se repitió el anterior cultivo celular con la diferencia de que en cada placa P24 no tratada se cultivaron, para los 4 tiempos (0, 2, 4 y 6 días), 2 condiciones: una suspensión sin microesferas cambiando el medio del mismo modo que en el anterior ensayo (SUSP) y otra suspensión celular añadiendo nuevo medio sin quitar el medio usado (SUSP-CTRL). En ambas condiciones se sembraron 100.000 células con 500 µL de medio de cultivo y se realizaron 4 réplicas destinadas al ensayo de cuantificación de DNA. En la condición SUSP se cambió el medio de cultivo cada 24 h de la misma manera que en el ensayo anterior. Mientras que para la condición SUSP-CTRL cada 24 h se añadieron 300 µL de medio de cultivo. Después, se congelaron y analizaron las muestras de la misma forma que en el ensayo anterior, a excepción de la elección del método de digestión ya que se utilizó el detergente Tris/Tritón x 100/ EDTA (0,5mM tris pH 8, 0,5% tritón, 100% EDTA).

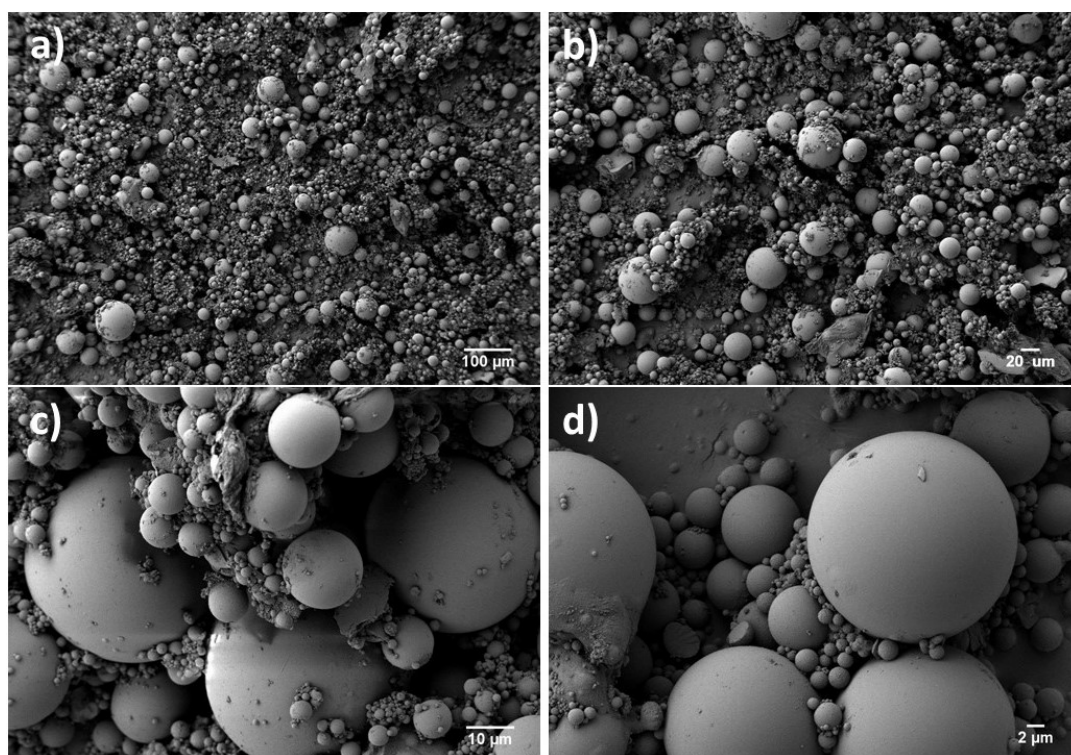


## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de las microesferas poliméricas.

#### 4.1.1 Microscopía electrónica de barrido.

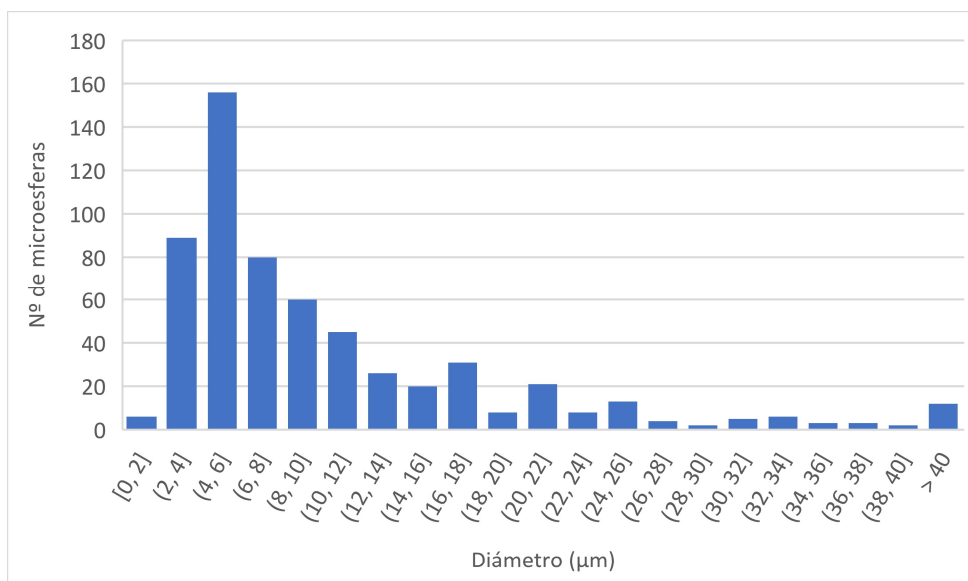
La obtención y caracterización de las microesferas constituye uno de los puntos con mayor envergadura en este trabajo, ya que es necesario establecer un soporte capaz de ser funcionalizado con biomoléculas de la médula ósea para mimetizar su entorno *in vitro*. La morfología y tamaño de las microesferas se caracterizó mediante FESEM. Para ello, se tomaron imágenes a distintos aumentos. En primer lugar, a 100x (Figura 10, a) se puede poseer una visión general de la disposición de las microesferas. Como se aprecia en la imagen, las microesferas no presentan un tamaño uniforme, además, aunque parece que algunas estén adheridas, no se agregan porque permanecen sueltas al finalizar el proceso de polimerización. También, se visualizan partículas no esféricas que se pueden corresponder con restos de PVA y microesferas. En segundo lugar, a 1000x (Figura 10, c) y 2000x (Figura 10, d) se consigue una mayor información sobre la topografía de la superficie de las microesferas. En ambas imágenes, se aprecia una superficie lisa con pequeños grumos, los cuales pueden ser moléculas de AA, ya que se deposita en la superficie, o microesferas fusionadas entre sí.



**Figura 10. Microesferas poliméricas.** Imágenes realizadas, con FESEM Ultra 55 (Zeiss Auriga Compact, Alemania), de las microesferas poliméricas sin HA injertado para su análisis morfométrico.

En último lugar, las imágenes de 200x (Figura 10, b) fueron procesadas para obtener la distribución de tamaños de las microesferas. Como se puede observar en la Figura 11, las microesferas presentan una distribución de tamaños heterogénea, sin embargo, la mayoría de

las microesferas tienen un diámetro entre 4 y 14  $\mu\text{m}$ . Por último, el diámetro medio de las microesferas, según la Tabla 3, es de 10,52  $\mu\text{m}$ , muy similar al diámetro deseado (10  $\mu\text{m}$ ) que pretende asemejarse al tamaño celular.



**Figura 11. Distribución de diámetros de las microesferas poliméricas.**

**Tabla 3. Parámetros descriptivos de la distribución de diámetros de las microesferas poliméricas.**

<b>Desviación Estándar</b>	9,54
<b>Varianza</b>	90,97
<b>Diámetro medio</b>	10,52
<b>Valor mínimo</b>	0,82
<b>Valor máximo</b>	72,20

#### 4.1.2 Técnica de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.

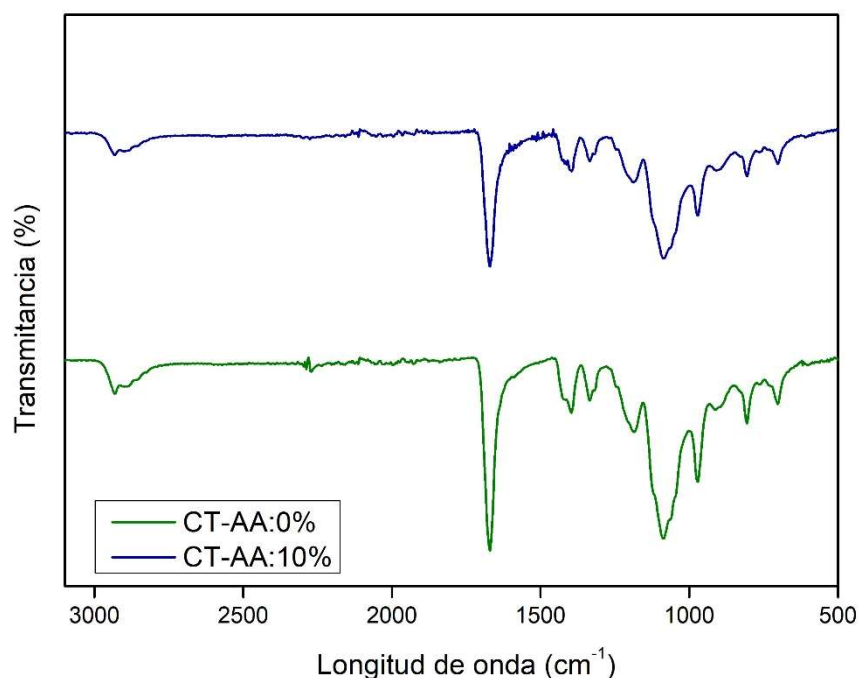
El ensayo FT-IR se realizó para comprobar la presencia de AA en las microesferas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, ambos espectros se componen de una amplia variedad de picos, entre los cuales, se van a detallar aquellos que son claves para conocer el contenido de los materiales ensayados.

En primer lugar, las microesferas con un 10% de AA (CT-AA:10%) y microesferas sin AA (CT-AA:0%) están formadas por copolímeros de acrilatos y metacrilatos que contienen grupos éster. Estos grupos suelen presentar picos entre 1750 y 1725  $\text{cm}^{-1}$  (Szymanski, 1964), en la Figura 12 se observa, para ambos tipos de microesferas, un pico de elevada intensidad entre ese intervalo.

En segundo lugar, la diferencia entre ambos tipos de microesferas es el AA. En la estructura química del AA destacan los grupos carboxilo (COOH), que se asignan con los picos que aparecen

entre 1725 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Szymanski, 1964). Sin embargo, en la Figura 12, en esas longitudes de onda sólo se encuentra el pico anteriormente descrito. Ello se debe a que la proporción de grupos éster es cuantitativamente mayor en las microesferas y, por tanto, no se pueden distinguir los grupos carboxilo del AA.

En definitiva, FT-IR es una técnica que proporciona información cualitativa con una elevada sensibilidad, no obstante, para este tipo de materiales no es la mejor técnica ya que no consigue distinguir los picos.



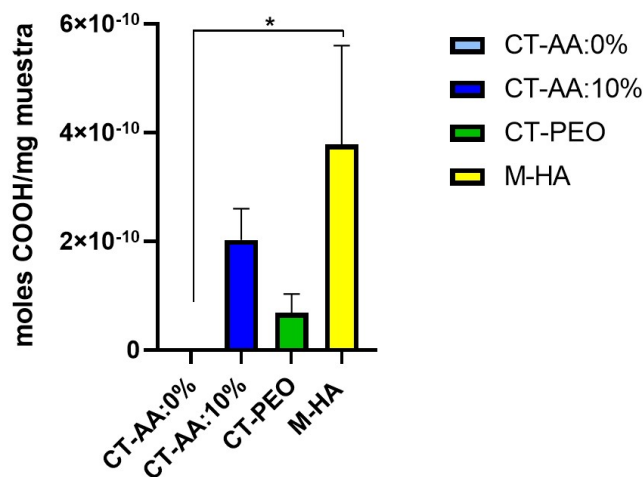
**Figura 12. Espectros del ensayo FT-IR.** Se analizaron dos condiciones: microesferas con un 10% de AA (CT-AA:10%) y microesferas sin AA (CT-AA:0%).

#### 4.2 Caracterización de la funcionalización de las microesferas mediante TBO.

Las microesferas poliméricas que presentan AA en su superficie disponen de grupos carboxilos para unirse al HA a través de la molécula puente PEO. Se utilizó el ensayo colorimétrico TBO para cuantificar el HA incorporado en las microesferas funcionalizadas.

En la Figura 13 se puede apreciar como las microesferas con HA (M-HA) presentan un mayor número de moles de grupos carboxilo que las microesferas sin AA (CT-AA:0%), microesferas con AA (CT-AA:10%) y microesferas con AA y polietilenglicol diamina (CT-PEO). Aunque el análisis estadístico (Anexo 7.1) mostró que solo se observan diferencias significativas entre M-HA y CT-AA:0%. Las microesferas CT-AA:0% no dan señal porque se han utilizado como control negativo ya que no contienen grupos carboxilo. También, se aprecia la tendencia del proceso de funcionalización, al principio las microesferas CT-AA:10% presentan grupos carboxilo y al incorporarles aminas (CT-PEO) se reduce el número de moles de grupos carboxilo. Sin embargo, como se puede apreciar en CT-PEO, la eficiencia no es del 100% ya que todavía quedan algunos

grupos carboxilo que no han podido reaccionar con las moléculas puente. Por último, al funcionalizar las microesferas con ácido hialurónico (M-HA) se produce un aumento del número de grupos carboxilo. Por tanto, utilizando esta técnica se ha podido comprobar que el recubrimiento de las microesferas con HA ha resultado exitoso.



**Figura 13. Resultados del ensayo TBO.** Se analizaron 4 condiciones: microesferas sin AA (CT-AA:0%), microesferas con AA (CT-AA:10%), microesferas con AA y polietilenglicol diamina (CT-PEO) y microesferas con HA (M-HA). El análisis estadístico proporciona un nivel de significación estadística: (\*) p-value ≤ 0,05.

#### 4.3 Caracterización de la línea celular U266.

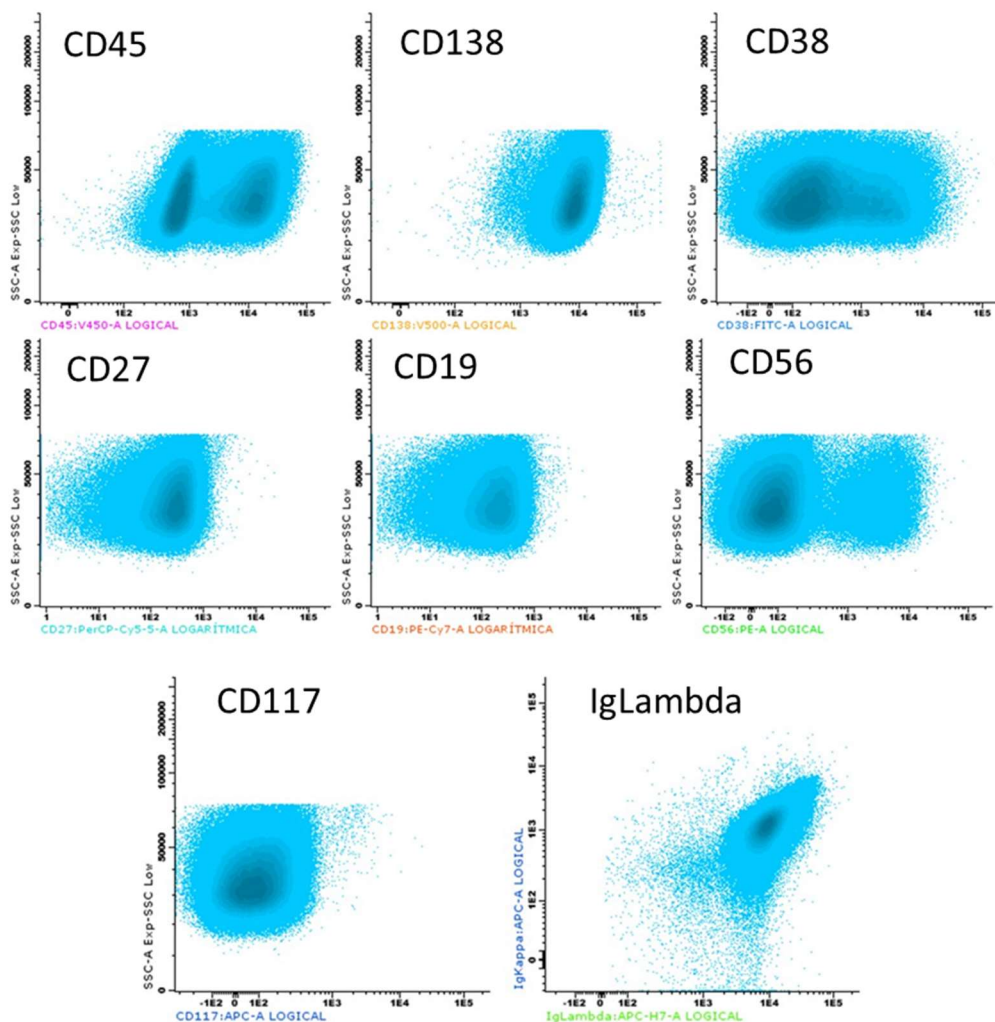
En los cultivos celulares se empleó la línea celular continua U266 ya que presenta las ventajas de crecer indefinidamente, ser más resistente a cambios experimentales y son fáciles de manejar, aunque pueden carecer del fenotipo deseado debido a que son genéticamente inestables.

Las células se obtuvieron de una casa comercial que autentifica la caracterización de la línea, no obstante, la línea celular ya ha sido utilizada por otro grupo de investigación. De forma que antes de establecer los cultivos es imprescindible comprobar la presencia de los marcadores celulares adecuados. Por ello, se utilizó la citometría de flujo para validar los marcadores superficiales e intracelulares de las células plasmáticas tumorales. El análisis, Figura 14, muestra que las células presentan marcadores positivos para CD138 y C81 y marcadores negativos para CD27, CD19 y CD117. Además, los marcadores CD56, CD38 y CD45 son positivos en algunas células y negativos en otras.

Los resultados obtenidos son propios de las células plasmáticas malignas. En primer lugar, este tipo de células se caracterizan por la elevada expresión de moléculas de adhesión CD138. En segundo lugar, las células plasmáticas normales presentan CD19 y CD27, mientras que las células tumorales pierden la expresión de estos marcadores (Flores-Montero *et al.*, 2016).

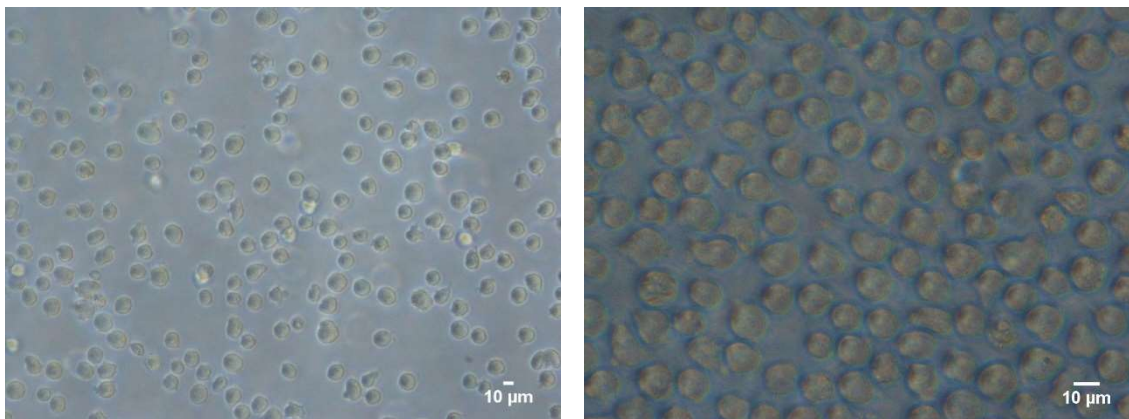
En tercer lugar, la expresión del marcador CD45 en células del MM es muy variable entre pacientes, por lo que a veces las células plasmáticas tumorales pueden presentar una distribución igual de CD45+ y CD45-. Ello también ocurre en marcadores como CD38 y CD56 (Tae-Dong *et al.*, 2012).

Por último, los marcadores CD81 y CD117 distinguen claramente entre células del MM y células plasmáticas normales (Fang *et al.*, 2018). Estos marcadores son los que más se suelen utilizar para el diagnóstico de la enfermedad. Ello se debe a que las células plasmáticas normales producen inmunoglobulinas policlonales con distintas combinaciones de cadenas pesadas (G, A, D, E y M) y cadenas ligeras (kappa o lambda). Mientras que las células del MM sólo producen un tipo de inmunoglobulina, es decir, sólo tienen un tipo de cadena pesada y cadena ligera. En este caso, el marcador de la inmunoglobulina kappa (CD117) es negativo y el de la inmunoglobulina lambda (CD81) es positivo, de manera que las células producen inmunoglobulinas monoclonales con la cadena ligera lambda. En definitiva, con el análisis de estos marcadores se ha comprobado que las células son plasmáticas malignas.



**Figura 14.** Dotplots del inmunofenotipo de la línea celular U266 utilizando citometría de flujo.

También, se validó la identidad de la línea celular con microscopía óptica para observar la morfología y ausencia de contaminaciones. En la Figura 15 se pueden apreciar que algunas células plasmáticas presentan formas irregulares debidas a las alteraciones morfológicas que padecen las células tumorales. También, a parte de las células plasmáticas malignas, no se aprecian otro tipo de células como microorganismos, por lo que inicialmente la línea escogida para los ensayos no poseía ningún tipo de contaminación.



**Figura 15. Imágenes de una suspensión celular de células plasmáticas malignas de la línea U266 tomadas con un microscopio óptico invertido.**

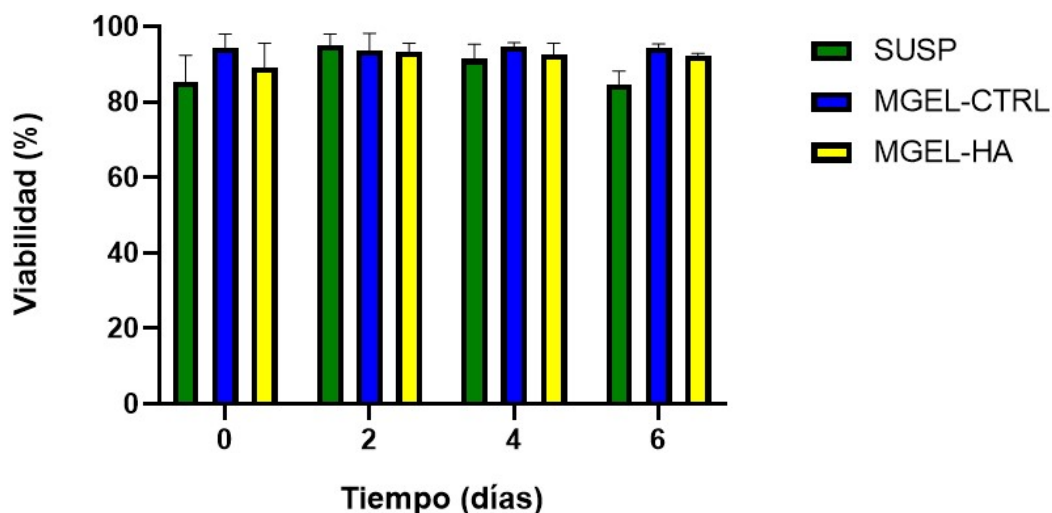
#### **4.4 Cultivos 3D.**

##### **4.4.1 Ensayo de viabilidad celular, LIVE/DEAD.**

El ensayo de viabilidad celular se realizó para evaluar *in vitro* la citotoxicidad de las microesferas mediante cultivos celulares a tiempos 0, 2, 4 y 6 días. Ello es fundamental en el proyecto, ya que la respuesta celular con el biomaterial es clave para asegurar su futuro uso en otros ensayos como cribados farmacológicos.

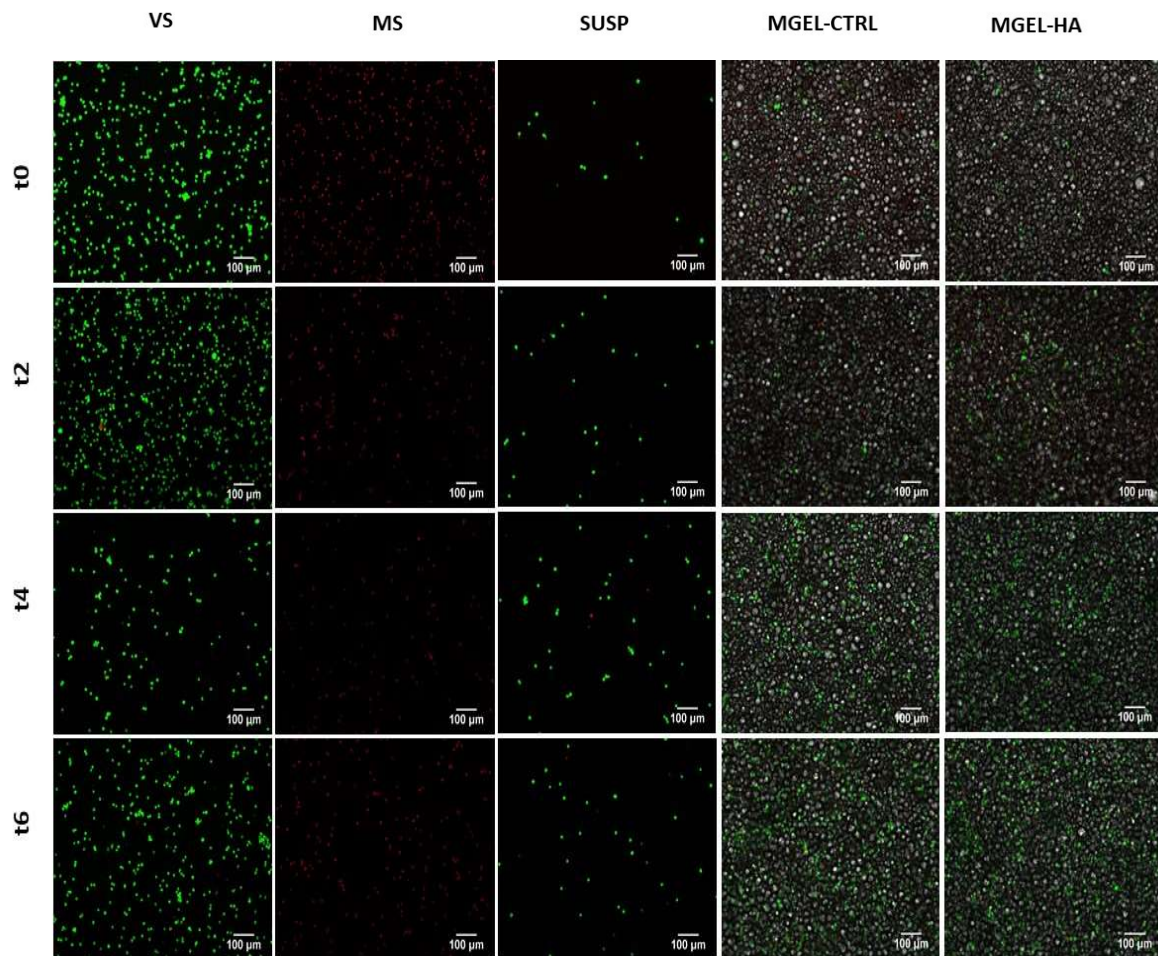
A pesar de que se ha confirmado que los copolímeros sintéticos empleados en la fabricación de las microesferas son altamente biocompatibles (Clara-Trujillo *et al.*, 2019), hay diferentes factores que pueden influir en la toxicidad de un biomaterial como el proceso de fabricación de las microesferas o las condiciones de cultivo. De ahí, que sea necesario testear la viabilidad del sistema de cultivo planteado.

Como se muestra en la Figura 16, la viabilidad del MGEL-HA y el MGEL-CTRL se mantiene durante los 4 tiempos de cultivo. Para que un biomaterial sea considerado no citotóxico, es decir, biocompatible, debe de presentar un porcentaje de viabilidad mayor o igual a un 70 % según la normativa *ISO10993-5 Parte 5: Test for in vitro cytotoxicity*. Ambos sistemas de cultivo compuestos por microesferas (MGEL- CTRL y MGEL HA) superan el 70% de viabilidad, por lo que no influyen negativamente en la proliferación celular. De modo que se ha podido demostrar que las microesferas, con o sin moléculas bioactivas de HA, presentan una excelente biocompatibilidad *in vitro*.

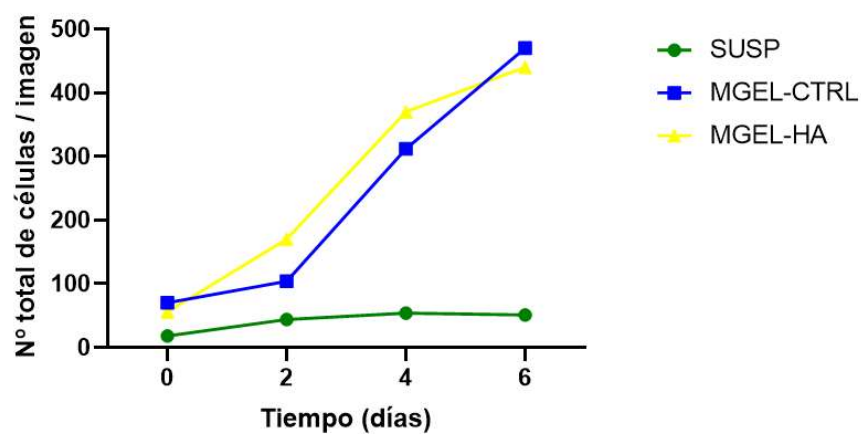


**Figura 16. Porcentajes de viabilidad del ensayo LIVE/DEAD.** Las muestras analizadas en los cultivos celulares fueron: células sin microesferas (SUSP), células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y células con microesferas funcionalizadas de HA (MGEL-HA).

Los porcentajes de viabilidad se obtuvieron contando el número de células de 4 campos, para cada condición, en las imágenes del LIVE/DEAD (Figura 17). Las condiciones VS y MS sirven de controles para demostrar que los fluorocromos funcionan en el marcaje de células vivas y muertas. En MGEL-CTRL y MGEL-HA, los resultados son positivos ya que se aprecia un aumento de células vivas en ambas. Sin embargo, en la condición SUSP, como se puede observar en estas fotos y la Figura 18, no se observa un aumento del número total de células conforme transcurre el tiempo. Ello pone en manifiesto que quizás se ha producido algún error durante el desarrollo experimental. Aun así, con el LIVE/DEAD sólo podemos establecer si un material es biocompatible o citotóxico, ya que el número de células que se cuentan en cada campo de una muestra observada con un microscopio de fluorescencia no es representativo de toda la muestra. Para conocer verdaderamente el número de células de cada condición se han de realizar otros ensayos que midan específicamente la proliferación celular.



**Figura 17. Imágenes del ensayo LIVE/DEAD a tiempos 0, 2, 4 y 6 días.** Donde se analizaron células vivas (VS), células muertas (MS), células sin microesferas (SUSP), células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y células con microesferas funcionalizadas de HA (MGEL-HA). A tiempo 0 se sembraron todas las condiciones con una densidad celular de 100.000 células.



**Figura 18. Representación del número total de células a distintos tiempos obtenidas a partir de las imágenes del LIVE/DEAD.**

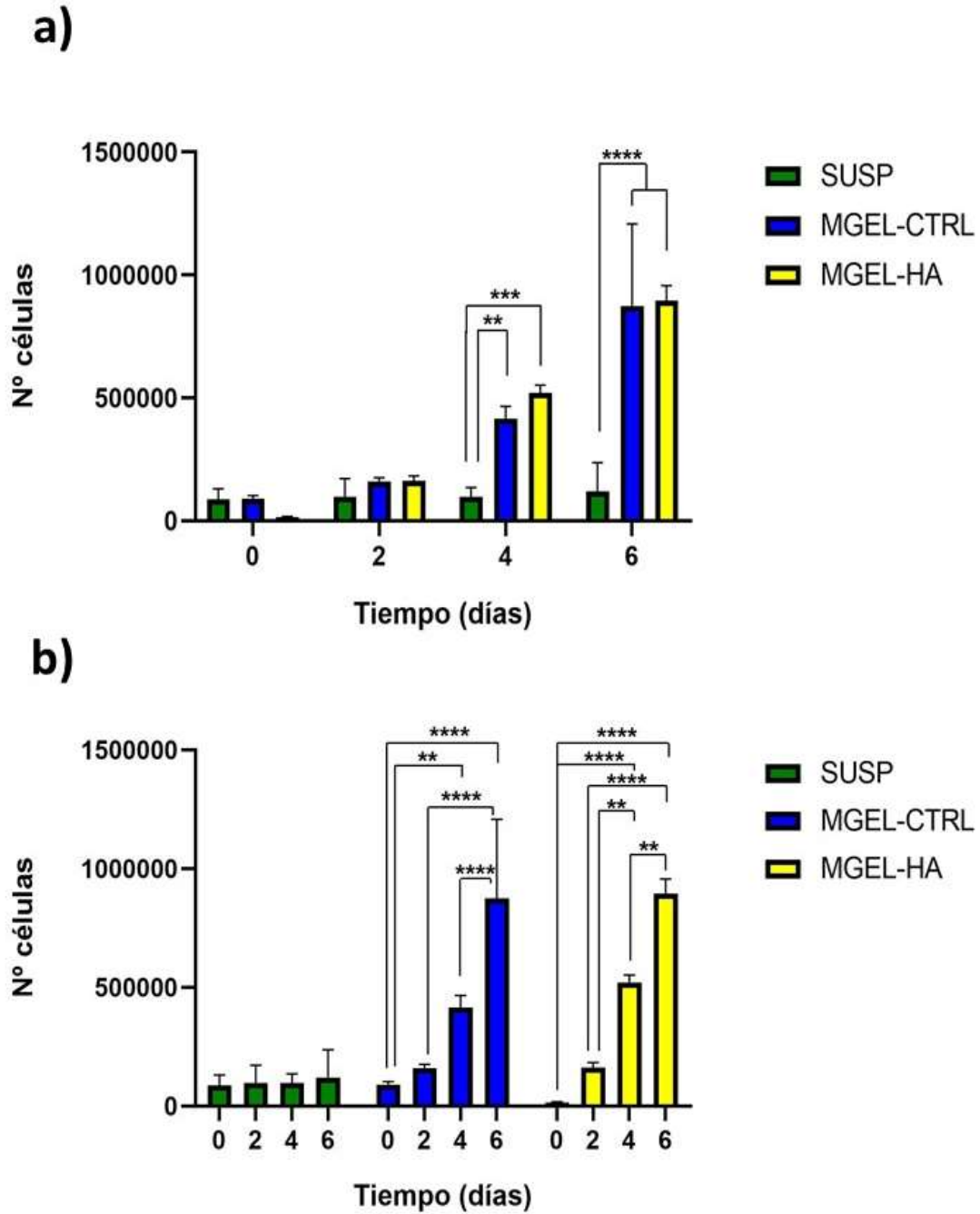


#### 4.4.2 Ensayo de proliferación celular.

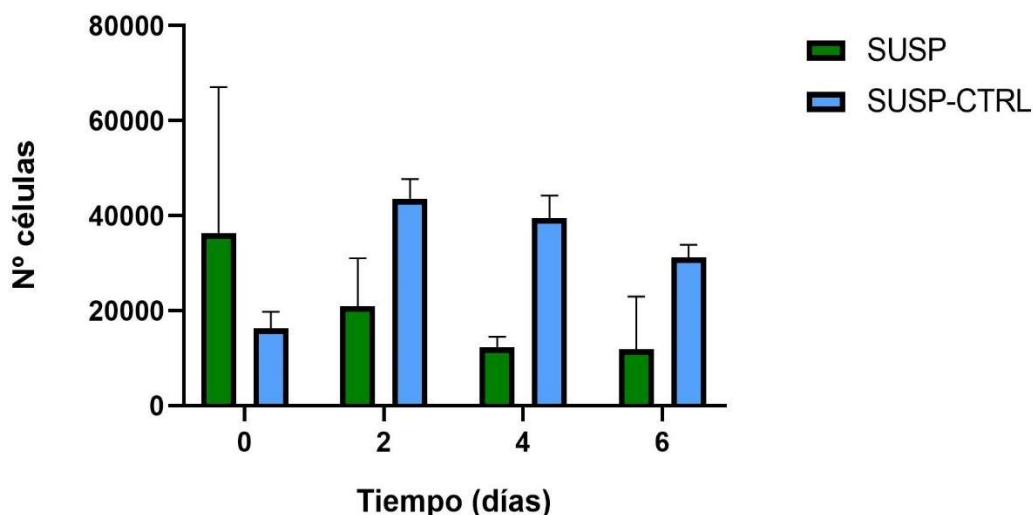
El ensayo de cuantificación del DNA permitió conocer la proliferación celular de cada condición (SUSP, MGEL-CTRL y MGEL-HA) durante 4 tiempos (0, 2, 4 y 6 días). En la Figura 19-b, el número de células aumenta conforme avanza el tiempo en las condiciones MGEL-CTRL y MGEL-HA, ya que según el análisis estadístico (Anexo 7.2) sólo se observan diferencias significativas, según un incremento del número de células, en cada tiempo, lo que indica que las células pueden proliferar en ambos materiales sin que estos supongan un impedimento. En cambio, en la condición SUSP el número de células se mantiene constante cuando se esperaba una proliferación igual o superior a la del microgel, por lo que se plantearon dos hipótesis:

1. Durante los cambios de medio de cultivo, realizados a todas las condiciones, se perdió un mayor número de células en las muestras SUSP que en el resto de condiciones. La causa de ello puede residir en que las células no precipitan a la misma velocidad que en las otras condiciones porque no contienen microesferas.
2. El microgel mejora la proliferación celular. La condición SUSP es un cultivo sin biomaterial soporte mientras que MGEL-CTRL y MGEL-HA son cultivos 3D. Por lo que existe la posibilidad de que en los cultivos con microesferas el crecimiento de las células se vea favorecido y puede que incluso más en la condición MGEL-HA dado que el HA mejora la proliferación de las células plasmáticas tumorales.

Para confirmar la primera hipótesis se planteó un cultivo celular alternativo, de esta manera, según la Figura 20, la condición SUSP ha dado un resultado similar al obtenido en el anterior ensayo, lo cual sugiere que las células se extravían, por esta razón no se aprecia una duplicación de la población celular en cada tiempo. Sin embargo, en la condición SUSP-CTRL tampoco se observa un crecimiento exponencial, pero sí se observa un número de células superior a la condición SUSP en cada tiempo. Cabe señalar que el hecho de obtener una proliferación celular tan baja en la condición SUSP-CTRL podría inclinarse a la segunda hipótesis, es decir, el microgel influye sobre el comportamiento de las células estimulando su crecimiento. Además, esta hipótesis se ve reforzada por las diferencias significativas (Figura 19-a) del análisis estadístico realizado (Anexo 7.2), desde el punto de vista de un incremento del número de células, entre el cultivo sin biomaterial soporte (SUSP) y los cultivos 3D (MGEL-CTRL y MGEL-HA). Aun así, esta segunda hipótesis no se puede afirmar con certeza porque inicialmente se sembraron 100.000 células en todas las muestras de ambos ensayos propuestos (Figura 19 y Figura 20) y siempre se ha detectado un menor número de células en el tiempo de siembra de los cultivos, es decir, el tiempo 0. Llama la atención que en la condición MGEL-HA, en la Figura 19, el número de células sea muy bajo a tiempo 0 y a tiempo 2 se doble la población. Ello deja entrever que las microesferas recubiertas con HA podrían estar perjudicando la detección del DNA dada la elevada viscosidad del injerto.

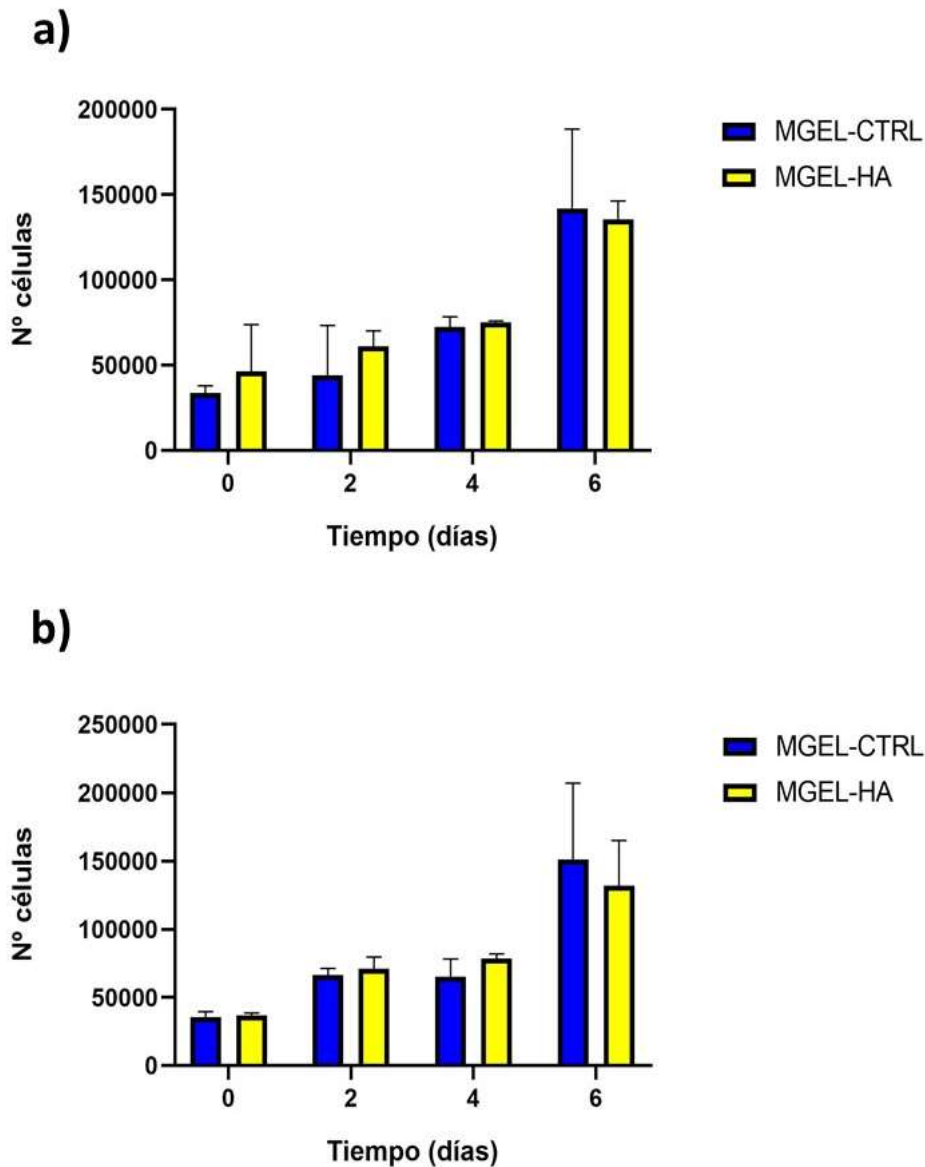


**Figura 19. Resultados de la proliferación celular obtenidos mediante el ensayo de cuantificación del DNA.** Las condiciones ensayadas son: células sin microesferas (SUSP), células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y células con microesferas funcionalizadas de HA (MGEL-HA). Se sembraron 100.000 células para cada condición. a) Para cada tiempo se comparan las condiciones. b) Cada condición se compara entre los distintos tiempos de cultivo. El análisis estadístico proporciona unos niveles de significación estadística: (\*) p-value  $\leq 0,05$  / (\*\*) p-value  $\leq 0,01$  / (\*\*\*) p-value  $\leq 0,001$  / (\*\*\*\*) p-value  $\leq 0,0001$ .



**Figura 20. Resultados de la proliferación celular de un cultivo celular alternativo con el ensayo de cuantificación del DNA.** Las condiciones ensayadas son: una suspensión celular sin microesferas cambiando el medio del mismo modo que en el anterior ensayo (SUSP) y otra suspensión celular sin microesferas añadiendo nuevo medio sin quitar el medio usado (SUSP-CTRL). En cada condición se sembraron inicialmente 100.000 células.

Se propuso otro ensayo de cuantificación de DNA para verificar si el microgel con HA influía negativamente sobre la detección de DNA. Para ello se utilizaron métodos de digestión distintos y más agresivos. En la Figura 21, se observa que para ambos tipos de digestión en la condición MGEL-HA a tiempo 0 sí que se detectan células. Pero la proliferación en los dos microgeles, tanto en la Figura 21-a como en la Figura 21-b, es muy similar, por lo que el HA realmente no dificulta la lisis de las células y, por tanto, no influye sobre la solubilización y detección del DNA. También, aunque en ambas condiciones aumente la proliferación a los tiempos ensayados, el número de células es incluso menor que en el primer ensayo porque las muestras se sometieron a una digestión doble que puede haber degradado una parte del DNA total.



**Figura 21. Resultados de la proliferación celular con métodos de digestión más agresivos mediante el ensayo de cuantificación del DNA.** para las condiciones: células sin microesferas (SUSP), células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y células con microesferas funcionalizadas de HA (MGEL-HA). a) Digestión con hialuronidasa. b) Digestión mediante Tris/Tritón x 100/ EDTA.

En definitiva, en base a los resultados de los diferentes ensayos, se puede determinar que el microgel con o sin HA permite la proliferación celular. Además, ambos microgeles influyen de una forma parecida sobre la proliferación celular, de manera que no se puede asegurar que el HA estimule el crecimiento celular en esta plataforma de cultivo. También, se ha verificado que las microesferas con HA no afectan a los procesos de digestión celular. Por otro lado, la metodología propuesta de cambio de medio no es la más acertada en el cultivo sin biomaterial soporte y, por último, la detección de un número menor de células en todos los ensayos puede que esté causada por errores experimentales, por ejemplo, el uso de la cámara Neubauer, errores de pipeteo y lavado de muestras.

## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las conclusiones de este trabajo final de grado:

1. Se han fabricado microesferas con copolímeros de acrilatos y ácido acrílico vía polimerización por emulsión para su utilización como microgeles. Se han caracterizado las microesferas estudiando su topografía y tamaño mediante FESEM. También se ha utilizado FT-IR para verificar que las microesferas contenían AA en su superficie.
2. Se ha obtenido HA de bajo peso molecular, el cual se ha utilizado para recubrir las microesferas. La funcionalización de las microesferas se ha comprobado gracias al ensayo TBO.
3. Se ha confirmado que la línea celular U266 presentaba los marcados superficiales e intracelulares propios de este tipo de células. También, mediante el uso de microscopia se ha observado que las células estaban libres de contaminaciones.
4. Se han establecido cultivos celulares *in vitro* con microgeles con y sin HA. Gracias al ensayo LIVE/DEAD se ha podido determinar que los biomateriales fabricados no son citotóxicos para las células del MM en los tiempos ensayados, es decir, son biocompatibles con las células U266. Mientras que en el ensayo de proliferación se ha podido confirmar que ambos microgeles permiten el crecimiento celular de manera similar ya que entre ellos no hay diferencias significativas, en lo que se refiere al número de células. Por último, se ha podido deducir que la metodología de cambio de medio no ha sido la más apropiada para el cultivo sin biomaterial soporte.

Con todo ello, se ha conseguido producir, funcionalizar y caracterizar microesferas para crear un cultivo 3D con células del MM que proporciona un microentorno biomimético a la médula ósea. En definitiva, el microgel posee un enorme potencial para el estudio de esta enfermedad, el descubrimiento de nuevos fármacos y la aplicación de tratamientos personalizados en pacientes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J., TRICOT, G., JACOBSON, J., ZANGARI, M., ANAISSIE, E., ... CROWLEY, J. (2004). Treatment of multiple mieloma. *Blood*, 103(1), 20–32.
- BRADLEY, R. M., MAXWELL, I. A., GILBERT, R. G., & NAPPER, D. H. (1992). Testing Nucleation Models for Emulsion-Polymerization Systems. *Polymer Latexes*, 492(3), 28-44.
- CARLETTI, E., MOTTA, A., & MIGLIARESI C. (2011). Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in molecular Biology*, 695, 17-39.
- CHORNG-SHYAN, C. (2008). *Principles and Applications of Emulsion Polymerization*. Wiley-Blackwell. Estados Unidos. 272.
- CLARA-TRUJILLO, S., MARÍN-PAYÁ, J., CORDÓN, L., SEMPERE, A., GALLEGO, F. G., & RIBELLES, J. L. G. (2019). Biomimetic microspheres for 3D mesenchymal stem cell culture and characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 177(1), 68-76.
- COWAN, A. J., ALLEN, C., BARAC, A., BASALEEM, H., BENSENOR, I., CURADO, M. P., ... FITZMAURICE, C. (2018). Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA oncology*, 4(9), 1221–1227.
- CRUZ, D. M., IVIRICO, J. L., GOMES, M. M., RIBELLES, J. L., SÁNCHEZ, M. S., REIS, R. L., & MANO, J. F. (2008). Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal Tissue Engineering Regenerative Medicine*, 2(6), 378-80.
- DE LA PUENTE, P., MUZ, B., GILSON, R. C., AZAB, F., LUDERER, M., KING, J., ... AZAB, A. K. (2015). 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials*, 73, 70–84.
- DHANDAYUTHAPANI, B., YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T., & KUMAR, S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 1-19.
- DIEGO, R. B., OLMEDILLA, M. P., AROCA, Á. S., RIBELLES, J. L. G., PRADAS, M. M., FERRER, G. G., & SÁNCHEZ, M. S. (2005). Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 40(18), 4881–4887.
- DUTTA, A. K., FINK, J. L., GRADY, J. P., MORGAN, G. J., MULLIGHAN, C. G., TO, L. B., ... ZANNETTINO, A. (2019). Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*, 33(2), 457–468.
- FANG, C., YANPING, H., XIAOHUI, W., SHUANG, F., ZHUOGANG, L., & JIHONG, Z. Expression of CD81 and CD117 in plasma cell myeloma and the relationship to prognosis. (2018). *Cancer Medicine*, 7(12), 5920-5927.
- FLORES-MONTERO, J., DE TUTE, R., PAIVA, B., PEREZ, J. J., BÖTTCHER, S., WIND, H., ... ORFAO, A. (2016). Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple mieloma. *Cytometry B Clin Cytom*, 90(1), 61-72.
- GAAZ, T. S., SULONG, A. B., AKHTAR, M. N., KADHUM, A. A., MOHAMAD, A. B., & AL-AMIERY, A. A. (2015). Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*, 20(12), 22833–22847.

- GECKIL, H., XU, F., ZHANG, X., MOON, S., & DEMIRCI, U. (2010). Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine*, 5(3), 469–484.
- GIULIANI, N., STORTI, P., BOLZONI, M., PALMA, B. D., & BONOMINI, S. (2011). Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 4(3), 325–337.
- HAJEK, R. (2013). Strategies for the Treatment of Multiple Myeloma in 2013: Moving Toward the Cure. *IntechOpen*, 1-13.
- HARKINS, W. D. (1945). A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization. *The Journal of Chemical Physics*, 13(9), 381.
- HIDESHIMA, T., NAKAMURA, N., CHAUHAN, D., & ANDERSON, K. C. (2001). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, 20(42), 5991-6000.
- JAKUBIKOVA, J., CHOLUJOVA, D., HIDESHIMA, T., GRONESOVA, P., SOLTYSOVA, A., HARADA, T., ... 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.
- JASIELEC, J. K., & JAKUBOWIAK, A. J. (2013). Current approaches to the initial treatment of symptomatic multiple myeloma. *International journal of hematologic oncology*, 2(1), 1-14.
- KAWAGUCHI, H. (2000). Functional polymer microspheres. *Progress in polymer science*, 25(8), 1171-1210.
- KNIGHT, E., & PRZYBORSKI, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*, 227(6), 746–756.
- KUMAR, S. K., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., GERTZ, M. A., BUADI, F. K., PANDEY, S., ... RAJKUMAR, S. V. (2014). Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 28(5), 1122–1128.
- KYLE, R. A., & RAJKUMAR, S. V. (2008). Multiple myeloma. *Blood*, 111(6), 2962–2972.
- KYLE, R. A., & RAJKUMAR, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23(1), 3–9.
- KYLE, R. A., & RAJKUMAR, S. V. (2009). Treatment of multiple myeloma: a comprehensive review. *Clinical lymphoma & myeloma*, 9(4), 278–288.
- LAURENCE, W. M. (2017). Introduction to Plastics and Polymers, in: *Permeability Properties of Plastics and Elastomers 4<sup>th</sup> Edition*. William Andrew. New York, 21-40.
- LI, R., & SCHORK, F. (2006). Modeling of the inhibition mechanism of acrylic acid polymerization. *Industrial and engineering chemistry*, 45(9), 3001-3008.
- MA, S., YU, B., PEI, X., & ZHOU, F. (2016). Structural hydrogels. *Polymer*, 98, 516-535.
- MANIER, S., SACCO, A., LELEU, X., GHOBRIAL, I. M., & ROCCARO, A. M. (2012). Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 1-5.

- MARVEL, C. S. (1963). *Introducción a la química orgánica de las macromoléculas de síntesis*. Editorial Reverté. Barcelona. 84.
- MATSUMOTO, T., & ABE, M. (2006). Bone destruction in multiple myeloma. *Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease, and Aging*, 1068(1),319-326.
- MCCUBREY, J.A., STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W., CHANG, F., ... FRANKLIN, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1263–1284.
- NARAYANAN, K. N., BIN, D., JONATHAN, T. B., AMITABHA, M., & BHAGAVATHI, A. N. (2014). Characterization of multiple myeloma clonal cell expansion and stromal Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hyaluronic acid-based 3D hydrogel. *In vivo*, 28(1), 67-73.
- NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., & KOLAR, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), 397–411.
- PAL, K., BANTHIA, A. K., & MAJUMDAR, D. K. (2007). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), 1-21.
- PARK, J. H., OH, C., SHIN, S. I., MOON, S. K., & OH, S. G. (2003). Preparation of hollow silica microspheres in W/O emulsions with polymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 266, 107-144.
- PITTINGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., ... MARSHAK, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.
- ROE, C. P. (1968). Surface chemistry aspects of emulsion polymerization. *Ind. Eng. Chem*, 60(9), 20-33.
- SAN MIGUEL, J. F., SCHLAG, R., KHUAGEVA, N. K., DIMOPOULOS, M. A., SHPILBERG, O., KROPFF, M., ... RICHARDSON, P. G. (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *New Engl J Med*, 359(9), 906-917.
- SANGHVI, A. B., MILLER, K. P., BELCHER, A. M., & SCHMIDT, C. E. (2005). Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer. *Nature Materials*, 4(6),496-502.
- SMITH, A., WISLOFF, F., & SAMSON, D. (2006). Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol*, 132, 410-451.
- SPEICHER, M. R., & PANTEL, K. (2014). Tumor signatures in the blood. *Nature Biotechnology*, 32, 441-443.
- SYED, I., GARG, S., & SARKAR, P. (2018). Entrapment of essential oils in hydrogels for biomedical applications in: *Polymeric Gels*. WP:125-141.
- SZYMANSKI, H. A. (1964). *Interpreted Infrared Spectra*. Springer. Luxemburgo. 297.



- TAE-DONG, J., CHAN-JEOUNG, P., HYOEUN, S., SEONGSOO, J., HYUN-SOOK, C., DOK, H. Y., ... KYOO, H. L. (2012). Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *Korean J Hematol*, 47(4), 260–266.
- TIAN, H., TANG, X., ZHUANG, X., CHEN, X., & JING, X. (2012). Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, 37(2), 237-280.
- TRAVLOS, G. S. (2006). Normal structure, function and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathology*, 34(5), 548-65.
- VAN DE DONK, N. W., LOKHORST, H. M., & BLOEM, A. C. (2005). Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple mieloma. *Leukemia*, 19(12), 2177-2185.
- VINCENT, T., & MECHTI, N. (2005). Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 46(6), 803-811.
- VINCENT, T., JOURDAN, M., SY, M. S., KLEIN, B., & MECHTI, N. (2001). Hyaluronic Acid Induces Survival and Proliferation of Human Myeloma Cells through an Interleukin-6-mediated Pathway Involving the Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *The journal of biological chemistry*, 276(18), 14728-14736.

## 7. Anexos

### 7.1 Resultados del análisis estadístico del ensayo de caracterización de las microesferas funcionalizadas mediante TBO.

A continuación, en la Tabla 4, se recogen los resultados del análisis estadístico realizado con los datos de absorbancia del ensayo TBO.

**Tabla 4. Resultados del análisis estadístico del ensayo TBO.** En esta tabla se muestran si existen o no diferencias significativas para cada una de las muestras, donde se analizaron 4 condiciones: microesferas sin AA (CT-AA:0%), microesferas con AA (CT-AA:10%), microesferas con AA y polietilenglicol diamina (CT-PEO) y microesferas con HA (M-HA).

<b>Number of families</b>	1		
<b>Number of comparisons per family</b>	6		
<b>Alpha</b>	0,05		
<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Rank sum diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
CT-AA:0% vs. CT-AA:10%	-6	No	ns
CT-AA:0% vs. CT-PEO	-3	No	ns
CT-AA:0% vs. M-HA	-9	Yes	*
CT-AA:10% vs. CT-PEO	3	No	ns
CT-AA:10% vs. M-HA	-3	No	ns
CT-PEO vs. M-HA	-6	No	ns

### 7.2 Resultados del análisis estadístico del ensayo de cuantificación del DNA.

En la Tabla 5, se presentan los resultados del análisis estadístico realizado con los datos de número de células de cada muestra en el ensayo de cuantificación del DNA.

**Tabla 5. Resultados del análisis estadístico del ensayo de cuantificación del DNA.** En esta tabla se muestran si existen o no diferencias significativas para cada una de las muestras, se analizaron las siguientes condiciones: células sin microesferas (SUSP), células con microesferas sin HA (MGEL-CTRL) y células con microesferas funcionalizadas de HA (MGEL-HA).

<b>Number of families</b>	1		
<b>Number of comparisons per family</b>	66		
<b>Alpha</b>	0,05		
<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>
0:SUSP vs. 0:MGEL-CTRL	-2018	-269999 to 265964	No
0:SUSP vs. 0:MGEL-HA	71378	-196604 to 339359	No
0:SUSP vs. 2:SUSP	-10385	-278366 to 257597	No
0:SUSP vs. 2:MGEL-CTRL	-73052	-341033 to 194929	No

0:SUSP vs. 2:MGEL-HA	-75329	-343311 to 192652	No
0:SUSP vs. 4:SUSP	-9859	-277840 to 258123	No
0:SUSP vs. 4:MGEL-CTRL	-327903	-595884 to -59922	Yes
0:SUSP vs. 4:MGEL-HA	-433318	-701299 to -165337	Yes
0:SUSP vs. 6:SUSP	-33773	-301754 to 234209	No
0:SUSP vs. 6:MGEL-CTRL	-787547	-1055528 to -519566	Yes
0:SUSP vs. 6:MGEL-HA	-807910	-1075892 to -539929	Yes
0:MGEL-CTRL vs. 0:MGEL-HA	73396	-194586 to 341377	No
0:MGEL-CTRL vs. 2:SUSP	-8367	-276348 to 259614	No
0:MGEL-CTRL vs. 2:MGEL-CTRL	-71034	-339016 to 196947	No
0:MGEL-CTRL vs. 2:MGEL-HA	-73312	-341293 to 194670	No
0:MGEL-CTRL vs. 4:SUSP	-7841	-275822 to 260141	No
0:MGEL-CTRL vs. 4:MGEL-CTRL	-325885	-593867 to -57904	Yes
0:MGEL-CTRL vs. 4:MGEL-HA	-431300	-699282 to -163319	Yes
0:MGEL-CTRL vs. 6:SUSP	-31755	-299736 to 236226	No
0:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-CTRL	-785529	-1053511 to -517548	Yes
0:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-HA	-805893	-1073874 to -537911	Yes
0:MGEL-HA vs. 2:SUSP	-81763	-349744 to 186219	No
0:MGEL-HA vs. 2:MGEL-CTRL	-144430	-412411 to 123552	No
0:MGEL-HA vs. 2:MGEL-HA	-146707	-414688 to 121274	No
0:MGEL-HA vs. 4:SUSP	-81236	-349218 to 186745	No
0:MGEL-HA vs. 4:MGEL-CTRL	-399281	-667262 to -131299	Yes
0:MGEL-HA vs. 4:MGEL-HA	-504696	-772677 to -236714	Yes
0:MGEL-HA vs. 6:SUSP	-105151	-373132 to 162831	No
0:MGEL-HA vs. 6:MGEL-CTRL	-858925	-1126906 to -590943	Yes
0:MGEL-HA vs. 6:MGEL-HA	-879288	-1147269 to -611307	Yes
2:SUSP vs. 2:MGEL-CTRL	-62667	-330649 to 205314	No
2:SUSP vs. 2:MGEL-HA	-64945	-332926 to 203037	No
2:SUSP vs. 4:SUSP	526,3	-267455 to 268508	No
2:SUSP vs. 4:MGEL-CTRL	-317518	-585500 to -49537	Yes
2:SUSP vs. 4:MGEL-HA	-422933	-690915 to -154952	Yes
2:SUSP vs. 6:SUSP	-23388	-291369 to 244593	No
2:SUSP vs. 6:MGEL-CTRL	-777162	-1045144 to -509181	Yes

2:SUSP vs. 6:MGEL-HA	-797526	-1065507 to -529544	Yes
2:MGEL-CTRL vs. 2:MGEL-HA	-2277	-270259 to 265704	No
2:MGEL-CTRL vs. 4:SUSP	63194	-204788 to 331175	No
2:MGEL-CTRL vs. 4:MGEL-CTRL	-254851	-522832 to 13130	No
2:MGEL-CTRL vs. 4:MGEL-HA	-360266	-628247 to -92285	Yes
2:MGEL-CTRL vs. 6:SUSP	39279	-228702 to 307261	No
2:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-CTRL	-714495	-982476 to -446514	Yes
2:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-HA	-734858	-1002840 to -466877	Yes
2:MGEL-HA vs. 4:SUSP	65471	-202511 to 333452	No
2:MGEL-HA vs. 4:MGEL-CTRL	-252574	-520555 to 15408	No
2:MGEL-HA vs. 4:MGEL-HA	-357989	-625970 to -90007	Yes
2:MGEL-HA vs. 6:SUSP	41557	-226425 to 309538	No
2:MGEL-HA vs. 6:MGEL-CTRL	-712218	-980199 to -444236	Yes
2:MGEL-HA vs. 6:MGEL-HA	-732581	-1000562 to -464600	Yes
4:SUSP vs. 4:MGEL-CTRL	-318045	-586026 to -50063	Yes
4:SUSP vs. 4:MGEL-HA	-423460	-691441 to -155478	Yes
4:SUSP vs. 6:SUSP	-23914	-291896 to 244067	No
4:SUSP vs. 6:MGEL-CTRL	-777689	-1045670 to -509707	Yes
4:SUSP vs. 6:MGEL-HA	-798052	-1066033 to -530070	Yes
4:MGEL-CTRL vs. 4:MGEL-HA	-105415	-373396 to 162566	No
4:MGEL-CTRL vs. 6:SUSP	294130	26149 to 562112	Yes
4:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-CTRL	-459644	-727625 to -191663	Yes
4:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-HA	-480007	-747989 to -212026	Yes
4:MGEL-HA vs. 6:SUSP	399545	131564 to 667527	Yes
4:MGEL-HA vs. 6:MGEL-CTRL	-354229	-622210 to -86248	Yes
4:MGEL-HA vs. 6:MGEL-HA	-374592	-642574 to -106611	Yes
6:SUSP vs. 6:MGEL-CTRL	-753774	-1021756 to -485793	Yes
6:SUSP vs. 6:MGEL-HA	-774138	-1042119 to -506156	Yes
6:MGEL-CTRL vs. 6:MGEL-HA	-20363	-288345 to 247618	No