



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

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

Desarrollo de un modelo de enfermedad para el mieloma múltiple: Estudio de la interacción entre células tumorales y células madre mesenquimales.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Vicente Tomas, Carolina

Tutor/a: Gómez Ribelles, José Luís

Cotutor/a: García Briega, María Inmaculada

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSIAMN)



TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

## DESARROLLO DE UN MODELO DE ENFERMEDAD PARA EL MIELOMA MÚLTIPLE: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

**AUTORA:**

Carolina Vicente Tomás

**TUTOR:**

José Luís Gómez Ribelles

**COTUTORA:**

María Inmaculada García Briega

Curso académico 2022/2023

Valencia, 3 de julio de 2023

# DESARROLLO DE UN MODELO DE ENFERMEDAD PARA EL MIELOMA MÚLTIPLE: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

## RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica maligna causada por una proliferación descontrolada de las células plasmáticas (PCs), un tipo celular que surge de la diferenciación terminal de los linfocitos B. Las PCs transformadas producen una proteína monoclonal o proteína M que es característica de la enfermedad y, además, pueden infiltrarse en otros órganos, causando graves daños en los mismos. Se trata de la segunda neoplasia hematológica maligna más frecuente en Occidente y, pese a la multitud de fármacos que existen para el tratamiento, no se ha logrado encontrar ninguno que consiga la remisión completa de la enfermedad. Así, la mayoría de pacientes recaen tras el primer tratamiento y, aunque algunos de ellos pueden permanecer durante años en remisión, la realidad es que se trata de una enfermedad con una elevada tasa de mortalidad. Para comprender esta enfermedad, es necesario comprender el nicho biológico en el que se desarrolla, la médula ósea (BM). En esta se distinguen un componente acelular, conformado por las biomoléculas de la matriz extracelular (MEC) y un componente celular (osteoblastos, células madre mesenquimales (MSC), células madre hematopoyéticas, etc.). Se sabe que tanto el factor celular como el acelular son clave en la progresión de la enfermedad ya que favorecen la supervivencia y la proliferación de las células de mieloma múltiple (MMCs). Este efecto es debido tanto a la interacción indirecta de las MMCs con el resto de tipos celulares de la BM mediante el intercambio de factores solubles, como son las citocinas (IL-6 e IL-10) como a la adhesión (interacción directa) entre las MMCs y el resto de tipos celulares y las MMCs y los componentes de la MEC. Es por ello por lo que se vuelve fundamental el desarrollo de plataformas 3D para el cultivo de las MMCs, ya que, solo incorporando estos elementos, se puede replicar con fidelidad los eventos que se dan *in vivo* y que llevan al desarrollo de resistencia a fármacos y a la progresión de la neoplasia. Por ello, el objetivo de este trabajo es el desarrollo y optimización de una plataforma de cultivo que permita recrear el nicho tumoral empleando elementos presentes en este. De esta manera, se desarrollan micogeles biomiméticos (microesferas) funcionalizados con compuestos de la MEC de la BM (heparina, condroitín sulfato, colágeno I y ácido hialurónico). Los micogeles se incluyen en el cultivo 3D de las MMCs junto con MSCs humanas (hMSCs) con el objetivo de recrear el nicho tumoral. Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: 3. Salud y bienestar y 9. Industria, innovación e infraestructuras.

**PALABRAS CLAVE:** mieloma múltiple, microesferas, co-cultivo, células madre mesenquimales humanas.

**ALUMNA:** Carolina Vicente Tomás.

**TUTOR:** José Luíís Gómez Ribelles.

**COTUTORA:** María Inmaculada García Briega.

Valencia, 3 de julio de 2023.

# DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL DE MALALTIA PER AL MIELOMA MÚLTIPLE: ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE CÈL·LULES TUMORALS I CÈL·LULES MARE MESENQUIMALS

## RESUM

El mieloma múltiple (MM) és una neoplàsia hematològica maligna causada per una proliferació descontrolada de les cèl·lules plasmàtiques (PCs), un tipus cel·lular que sorgeix de la diferenciació terminal dels limfòcits B. Les PCs transformades produeixen una proteïna monoclonal o proteïna M que és característica de la malaltia i, a més, poden infiltrar-se en altres òrgans, causant greus danys en aquests. Es tracta de la segona neoplàsia hematològica maligna més freqüent a Occident i, malgrat la multitud de fàrmacs que existeixen per al tractament, no s'ha aconseguit trobar-ne cap que aconseguisca la remissió completa de la malaltia. Així, la majoria de pacients recauen després del primer tractament i, encara que alguns d'ells poden romandre durant anys en remissió, la realitat és que es tracta d'una malaltia amb una elevada taxa de mortalitat. Per a comprendre aquesta malaltia, és necessari comprendre el nínxol biològic en el qual es desenvolupa, la medul·la òssia (BM). En aquesta es distingeixen un component acèl·lular, conformat per les biomolècules de la matriu extracel·lular (MEC) i un component cel·lular (osteoblastos, cèl·lules mare mesenquimals (MSC), cèl·lules mare hematopoètiques, etc.). Se sap que tant el factor cel·lular com l'acèl·lular són clau en la progressió de la malaltia ja que afavoreixen la supervivència i la proliferació de les cèl·lules de mieloma múltiple (MMCs). Aquest efecte és degut tant a la interacció indirecta de les MMCs amb la resta de tipus cel·lulars de la BM mitjançant l'intercanvi de factors solubles, com són les citocines (IL-6 i IL-10) com a l'adhesió (interacció directa) entre les MMCs i la resta de tipus cel·lulars i les MMCs i els components de la MEC. És per això que es torna fonamental el desenvolupament de plataformes 3D per al cultiu de les MMCs, ja que, tan sols si s'incorporen aquests elements, es pot replicar amb fidelitat els esdeveniments que es donen *in vivo* i que porten al desenvolupament de resistència a fàrmacs i a la progressió de la neoplàsia. Per això, l'objectiu d'aquest treball és el desenvolupament i optimització d'una plataforma de cultiu que permeta recrear el nínxol tumoral emprant elements presents en aquest. D'aquesta manera, es desenvolupen microgels \*biomimètics (microesferes) funcionalitzats amb compostos de la MEC de la BM (heparina, condroití sulfat, col·lagen I i àcid hialurònic). Els microgels s'inclouen en el cultiu 3D de les MMCs juntament amb MSCs humanes (hMSCs) amb l'objectiu de recrear el nínxol tumoral. Aquest treball es relaciona amb els següents ODS de l'Agenda 2030: 3. Salut i benestar i 9. Indústria, innovació i infraestructures.

**PARAULES CLAU:** mieloma múltiple, microesferes, co-cultiu, cèl·lules mare mesenquimals humans.

**ALUMNA:** Carolina Vicente Tomás.

**TUTOR:** José Luís Gómez Ribelles.

**COTUTORA:** María Inmaculada García Briega.

València, 3 de juliol de 2023.

# DEVELOPMENT OF A DISEASE MODEL FOR MULTIPLE MYELOMA: STUDY OF INTERACTION BETWEEN TUMOUR CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS

## ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a haematological malignancy caused by an uncontrolled proliferation of plasma cells (PCs), a cell type that arises from the terminal differentiation of B lymphocytes. The transformed PCs produce a monoclonal protein or M protein that is characteristic of the disease and can also infiltrate other organs, causing severe organ damage. It is the second most common haematological malignancy in The West and, despite the multitude of drugs available for treatment, none have been found to achieve complete remission of the disease. Thus, most patients relapse after the first treatment and, although some of them may remain in remission for years, the reality is that it is a disease with a high mortality rate. To understand this disease, it is necessary to understand the biological niche in which it develops, the bone marrow (BM). In BM, an acellular component, consisting of extracellular matrix (ECM) biomolecules, and a cellular component (osteoblasts, mesenchymal stem cells (MSCs), haematopoietic stem cells, etc.) are distinguished. Both cellular and acellular factors are known to play a key role in disease progression by promoting the survival and proliferation of multiple myeloma cells (MMCs). This effect is due to both the indirect interaction of the MMCs with the other cell types in the BM through the exchange of soluble factors, such as cytokines (IL-6 and IL-10) and the adhesion (direct interaction) between the MMCs and the other cell types and the MMCs and the components of the ECM. This is why it is essential to develop 3D platforms for the culture of MMCs, since only by incorporating these elements can the events that occur in vivo and lead to the development of drug resistance and the progression of the neoplasm be faithfully replicated. Therefore, the aim of this work is the development and optimisation of a culture platform that allows the recreation of the tumour niche using elements present in the tumour. In this way, biomimetic microgels (microspheres) functionalised with compounds from the ECM of the BM (heparin, chondroitin sulphate, collagen I and hyaluronic acid) are developed. The microgels are included in the 3D culture of BMs together with human MSCs (hMSCs) with the aim of recreating the tumour niche. This work relates to the following SDGs of the 2030 Agenda: 3. Health and well-being and 9. Industry, innovation and infrastructure.

**KEY WORDS:** multiple myeloma, microspheres, co-culture, human mesenchymal stem cells.

**STUDENT:** Carolina Vicente Tomás.

**TUTOR:** José Luís Gómez Ribelles.

**COTUTOR:** María Inmaculada García Briega.

Valencia, 3<sup>rd</sup> July, 2023.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi tutor José Luís por haberme dado la oportunidad de seguir un año más en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) aprendiendo y mejorando y por depositar tanta confianza en mí. A Inma, mi cotutora, agradecerle el esfuerzo, tiempo y dedicación; gracias por las interminables horas que has dedicado a mi formación y a resolver mis mil dudas. A Ximo y Julia, agradecer su ayuda, aunque no fuera su responsabilidad.

Agradecer también a todos los compañeros del CBIT, por crear un ambiente de trabajo agradable y acogedor. En especial, quiero dar las gracias a Alison, Amy, Barbara, María y Patri por ser la mejor compañía que podría haber tenido durante estos meses, por todas las risas y anécdotas y por el apoyo en los momentos más difíciles. Alison, te estaré eternamente agradecida por estar todos los días a mi lado en el laboratorio, por animarme a seguir cuando me sentía desbordada, por tus palabras de ánimo, por tu amabilidad y comprensión. Sois increíbles chicas y me siento muy orgullosa de poder llamaros amigas.

Por otro lado, quiero agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres, por estar ahí día tras día, por entender mi agobio y darme un espacio seguro en el que expresarme. Gracias por confiar tanto en mí y por la seguridad de que conseguiría mis objetivos. Os quiero mucho y no podría haberlo hecho sin vuestro apoyo. Quiero agradecer también a mis amigas del pueblo, en especial a Nerea, por poder contarle todos los días durante 4 años cuán estresada estaba y haberme escuchado todos y cada uno de ellos. A mis compañeras de piso, gracias por las cenas “en familia”, las largas horas en el salón estudiando en compañía y por todas nuestras conversaciones del día a día. Gracias a mi pareja, por haber estado ahí en mis mejores días, pero, sobre todo, en los peores, por ayudarme a seguir, por entenderme y apoyarme en todas mis decisiones.

Por último, pero no menos importante, quiero dar gracias a las personas que me han acompañado día tras día estos 4 años. Adrián, Alberto, Alejandro, Ángela, Carla, Carlos, Claudia, Elisa, Gloria, Lucía, Manuel, Marc, Maria, Miriam y Tania sois lo mejor que me llevo del grado, me siento enormemente feliz por haberme encontrado con vosotros, de lo contrario, nada hubiera sido igual. Gracias por levantarme cuando me he caído, por ser mis compañeros de biblioteca, por las risas, pero también por los lloros, por los viajes hechos y por hacer, por las noches de fiesta, pero también por las noches de comida casera y película, por las meriendas de churros con chocolate y por los fines de semana que hemos pasado en la caseta de Maria. Gracias por todo esto y por todo lo que no soy capaz de expresar con palabras. Os quiero y, aunque podamos decir bien orgullosos que ¡ya somos biotecnólogos!, os echaré de menos.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	CÉLULAS PLASMÁTICAS Y MIELOMA MÚLTIPLE.....	1
1.2.	NICHO BIOLÓGICO DEL MIELOMA MÚLTIPLE: LA MÉDULA ÓSEA .....	4
1.2.1.	COMPONENTE ACELULAR .....	6
1.2.2.	COMPONENTE CELULAR.....	7
1.3.	MODELOS DE ENFERMEDAD <i>IN VITRO</i> .....	8
2.	OBJETIVOS .....	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1.	MATERIALES .....	9
3.2.	SÍNTESIS DE MICROESFERAS MAGNÉTICAS DE ALGINATO .....	10
3.2.1.	DISOLUCIONES.....	10
3.2.2.	MICROESFERAS.....	11
3.3.	FUNCIONALIZACIÓN DE MICROESFERAS POR LAYER BY LAYER (LbL) .....	12
3.3.1.	LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y CONDROITÍN SULFATO (LbL PLL/CS).....	12
3.3.2.	LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y HEPARINA (LbL PLL/Hep).....	13
3.3.3.	LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO (LbL PLL/HA) .....	14
3.3.4.	LAYER BY LAYER DE COLÁGENO (LbL Col I) .....	14
3.4.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA: MICROSCOPIA ÓPTICA .....	15
3.5.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS MICROESFERAS Y SUS FUNCIONALIZACIONES 16	
3.5.1.	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) 16	
3.5.2.	BLYSCAN .....	16
3.5.3.	HIDROXIPROLINA.....	17
3.5.4.	NINHIDRINA.....	17
3.6.	CULTIVO CELULAR .....	17
3.6.1.	FABRICACIÓN DEL POCILLO DE CULTIVO .....	17
3.6.2.	LINEAS CELULARES .....	18
3.6.3.	DESCONGELACIÓN Y EXPANSIÓN CELULAR .....	18
3.6.4.	SIEMBRA Y CULTIVO .....	19
3.6.5.	ENSAYOS CELULARES.....	21
3.6.5.1.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	21
3.6.5.2.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS (MTS).....	21
3.6.5.3.	PROLIFERACIÓN CELULAR (CICLO CELULAR) .....	22

3.6.5.4. VIABILIDAD CELULAR (APOPTOSIS) .....	22
3.6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS .....	24
4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS .....	25
4.2.1. FTIR.....	25
4.2.2. BLYSCAN .....	27
4.2.3. HIDROXIPROLINA.....	27
4.2.4. NINHIDIRNA.....	28
4.3. CULTIVOS CELULARES.....	28
4.3.1. CO-CULTIVO SIN MICROGEL.....	29
4.3.2. CO-CULTIVO CON MICROGEL .....	31
4.3.3. CO-CULTIVO CON Y SIN MICROGEL.....	33
5. CONCLUSIONES .....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37
7. ANEXO .....	41
7.1. OBJETIVOS DEL DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS).....	41
7.2. IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA COMPLEMENTARIAS .....	42
7.3. FIGURAS COMPLEMENTARIAS AL ANÁLISIS FTIR .....	44
7.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CICLO CELULAR Y APOPTOSIS.....	47
7.4.1. CICLO CELULAR.....	47
7.4.2. APOPTOSIS .....	48
7.4.3. PORCENTAJE DE MMCs EN LAS MUESTRAS DEL CULTIVO .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de diferenciación de célula madre hematopoyética multipotente a célula plasmática. Extraída de (Banchereau & Rousset, 1992).....	1
<b>Figura 2.</b> Células plasmáticas, los distintos factores inmunitario (distintos de Ig) que secretan y los procesos en que participan. Representados en rojo los elementos inflamatorios y en verde los antiinflamatorios. Extraída de (Pioli, 2019). .....	2
<b>Figura 3.</b> Esquema de la organización de la médula ósea y sus componentes. Extraída de (Abarrategi et al., 2018). .....	5
<b>Figura 4.</b> Sistema de síntesis de microesferas. Se muestra el medio continuo, discontinuo, colector, el sistema de microfluídica y las microesferas.....	11
<b>Figura 5.</b> Sistema de microfluídica. El punto 1 sirve de entrada para el medio continuo, el 2 para el discontinuo y el 3 para la salida de microesferas y su recogida gracias al medio colector. ....	11
<b>Figura 6.</b> Microesfera funcionalizada mediante el procedimiento LbL con el polimerización PLL y el polimerización que puede ser CS, Hep o HA. Creado con BioRender.com .....	14
<b>Figura 7.</b> Microesfera funcionalizada mediante el procedimiento LbL con el polimerización PLL, el polimerización CS y el injerto de Col I mediante el GA. Creado con BioRender.com .....	15
<b>Figura 8.</b> Soporte de cultivo/hidrogel de agarosa (1,5% p/v) cúbico con 4 pocillos de forma cónica. ....	18
<b>Figura 9.</b> Soportes de cultivo/hidrogel en placa p12 para el cultivo celular. ....	19
<b>Figura 10.</b> Ilustración del cultivo celular mostrando las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW. Creado con BioRender.com .....	20
<b>Figura 11.</b> A) Distribución del diámetro de las MO de alginato con ferrita sin funcionalizar. B) MO observadas en el microscopio invertido en una escala de 100 $\mu\text{m}$ .....	24
<b>Figura 12.</b> Espectros de FTIR de las MO, MO PLL/CS, MO Col I, MO PLL/Hep y MO PLL/HA y sus picos característicos. ....	25
<b>Figura 13.</b> Representación de la cantidad de PLL (ng/ $\mu\text{L}$ de microesferas). Se muestran las MO (1) y las MO recubiertas con 1 bicapa (2), 2 bicapas (3) y 3 bicapas (4). ....	28
<b>Figura 14.</b> Ensayo MTS de proliferación de MMCs a 3 y 7 días en las condiciones CTRL, DIR y COX. ....	29
<b>Figura 15.</b> A) Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, DIR y COX. B) Ensayo de apoptosis (viabilidad celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, DIR y COX.....	30
<b>Figura 16.</b> MTS de proliferación de MMCs a 3 y 7 días en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW. ....	32
<b>Figura 17.</b> A) Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW. B) Ensayo de apoptosis (viabilidad celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW. ....	33
<b>Figura 18.</b> Ensayo MTS de proliferación de MMCs a 3, 5 y 7 días en las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW. ....	34
<b>Figura 19.</b> Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a día 3 en las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW.....	35
<b>Figura 20.</b> Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/CS a una escala de 100 $\mu\text{m}$ ...	42
<b>Figura 21.</b> Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/Hep a una escala de 100 $\mu\text{m}$ .	42
<b>Figura 22.</b> Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/HA a una escala de 100 $\mu\text{m}$ .	43

<b>Figura 23.</b> Imagen de microscopía de las MO con LbL Col I a una escala de 100 $\mu\text{m}$ . .....	43
<b>Figura 24.</b> Espectro de FTIR del alginato y de las MO no funcionalizadas. ....	44
<b>Figura 25.</b> Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/CS. ....	44
<b>Figura 26.</b> Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/Hep. ....	45
<b>Figura 27.</b> Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/HA. ....	45
<b>Figura 28.</b> Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO Col I. ....	46
<b>Figura 29.</b> Análisis de los datos de ciclo celular con el software Flowing. Se muestra en morado los datos que se corresponden a las células. ....	47
<b>Figura 30.</b> Detalle del DotPlot obtenido al representar los datos de ciclo celular. Se muestra la región de correspondiente a las células y, dentro de esta, las fases G0/G1 en morado, S granate y G2/M azul. ....	47
<b>Figura 31.</b> Análisis de los datos de apoptosis con el software Flowing. Se muestran en morado los datos que se corresponden a las células apoptóticas; en azul los correspondientes a las células vivas que sean singletes y en granate las muertas. ....	48
<b>Figura 32.</b> Análisis del % de cada tipo celular (MMCs y hMSCs) en las muestras de apoptosis y ciclo celular. ....	49

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**Ac:** anticuerpo.

**Alg:** alginato.

**ASCT:** trasplante autólogo de células madre.

**BCMA:** antígeno de maduración de las células B.

**BM:** médula ósea.

**CAR-T:** células T receptoras de antígenos quiméricos.

**Col I:** colágeno I.

**COW:** condición indirecta de cultivo con MMCs, las hMSCs fuera del pocillo y las microesferas dentro del pocillo.

**COX:** condición indirecta de cultivo con MMCs y las hMSCs fuera del pocillo.

**CS:** condroitín sulfato.

**CTRL:** condición de cultivo control (MMCs).

**D3:** día 3.

**D5:** día 5.

**D7:** día 7.

**DIR:** condición directa de cultivo con MMCs y pellet de hMSCs en el mismo pocillo.

**DMEM (medio):** medio Eagle modificado de Dulbecco.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DPBS:** solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.

**EDC:** N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**FBS:** suero bovino fetal.

**FTIR:** espectroscopía de infrarrojos por la transformada de Fourier.

**GA:** glutaraldehído.

**GAGs:** glicosaminoglicanos.

**Gly:** glicina.

**HA:** ácido hialurónico.

**Hep:** heparina.

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos.

**hMSCs:** células madre mesenquimales humanas.

**HSC:** las células madre hematopoyéticas.

**HSPC:** células progenitoras hematopoyéticas.

**ICAM-1:** moléculas de adhesión intercelular 1.

**Ig:** inmunoglobulina.

**IGF:** factores de crecimiento similares a la insulina.

**IL:** interleuquina/interleucina.

**LbL:** Layer by Layer.

**L-glut:** L-glutamina.

**MC:** medio continuo.

**MCol:** medio colector.

**MCR:** condición de cultivo con MMCs con microesferas.

**MD:** medio discontinuo.

**MDE:** eventos definitorios de mieloma.

**MEC:** matriz extracelular.

**MGUS:** gammapatía monoclonal de significado incierto.

**MM:** mieloma múltiple.

**MMCs:** células de mieloma múltiple.

**MO:** microesferas magnéticas de alginato.

**MSC:** células madre mesenquimales.

**MTS:** se refiere tanto al ensayo de viabilidad celular como al compuesto (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium que da nombre al ensayo.

**NHS:** N-hidroxisuccinimida.

**P/S:** penicilina/estreptomina.

**PCs:** células plasmáticas.

**PI:** yoduro de propidio.

**RB:** réplica biológica.

**RMN:** resonancia magnética nuclear.

**RPMI (medio):** Roswell Park Memorial Institute.

**SD:** desviación estándar.

**SDF-1:** factor 1 derivado del estroma.

**SFR (medio):** sin rojo fenol.

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

**VCAM-1:** moléculas de adhesión a células vasculares 1.

**VCd:** terapia de inducción que incluye los fármacos bortezomib, ciclofosfamida y dexametasona.

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular.

**VRd:** terapia de inducción que incluye los fármacos bortezomib, lenalidomida, dexametasona.

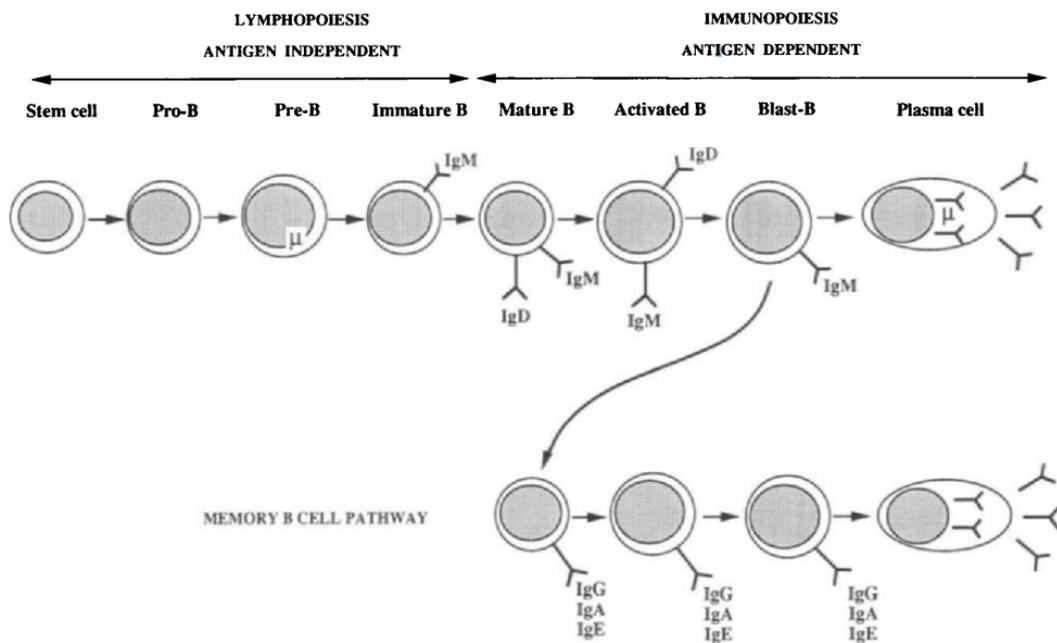
**VTd:** terapia de inducción que incluye los fármacos bortezomib, talidomida y dexametasona.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CÉLULAS PLASMÁTICAS Y MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica maligna causada por una proliferación descontrolada de las células plasmáticas (PCs) (Marín-Payá et al., 2022), un tipo celular que surge de la diferenciación terminal de los linfocitos B.

Para la formación de estas PCs, se han sucedido diferentes eventos que transformarán paulatinamente la célula madre hematopoyética multipotente y que se esquematizan en la Figura 1. La primera etapa es la linfopoyesis B, que se lleva a cabo en el hígado fetal y en la médula ósea de individuos adultos. A lo largo de este proceso, la mencionada célula madre se compromete al linaje celular de los linfocitos B, formando una célula pro-B. Tras ello, se da un reordenamiento genético de las cadenas pesadas, lo que lleva a la formación de una células pre-B que se expanden y, algunas de ellas, se reorganizan. Las células que hayan sufrido ambos reordenamientos son las células B inmaduras y expresarán inmunoglobulina (Ig) M o IgM en su superficie celular. Tras este proceso, las células B inmaduras no autorreactivas sufren una transformación a linfocito B maduro o *naive* que expresa IgD, además de IgM. Las células B permanecen en estado maduro hasta su unión a un antígeno, iniciándose el proceso de inmunopoyesis, que se da en órganos linfoides secundarios. En este proceso, las células sufren una serie de cambios que las llevan a su estado activo. Si la célula sigue recibiendo estímulos, se divide y se diferencia en blasto-B, que migra a la médula ósea donde se da la diferenciación final hasta PCs. Finalmente, los blastos de células B dejan de proliferar y se diferencian en células B de memoria (Banchereau & Rousset, 1992).

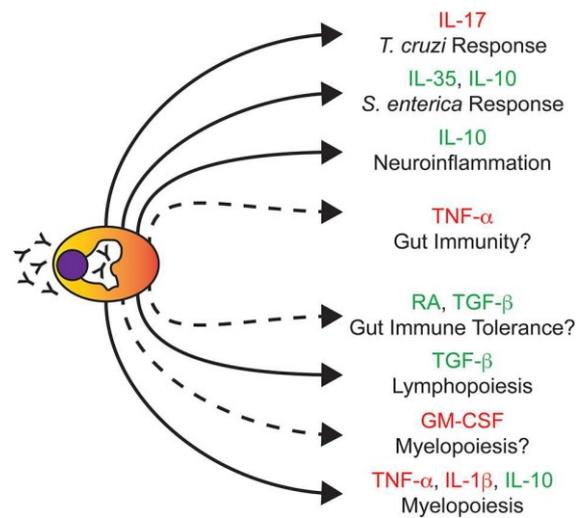


**Figura 1.** Proceso de diferenciación de célula madre hematopoyética multipotente a célula plasmática. Extraída de (Banchereau & Rousset, 1992).

Las PCs que se obtienen tras el proceso de diferenciación son células que no se dividen y cuya principal función es la secreción de anticuerpos (Ac) para proteger al organismo de las distintas

amenazas a las que se ve expuesto, siendo así parte de la compleja red que es la inmunidad humoral (Pioli, 2019). La prolongada vida media de las PCs podría ser uno de los motivos por los que los anticuerpos generados tras la vacunación contra ciertas enfermedades pueden persistir en el organismo del individuo vacunado durante periodos prolongados de tiempo, incluso décadas (Fillatreau, 2018).

Aunque durante años se ha creído que la secreción de Acs era su única función, se ha visto que también pueden producir citocinas tanto inflamatorias como antiinflamatorias, incluyendo en este grupo las interleucinas (IL), siendo las más características de este tipo celular las IL-17, IL-10 e IL-35. Además de las IL y las Ig, las PCs también pueden producir y secretar otros factores (Pioli, 2019) tal y como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Células plasmáticas, los distintos factores inmunitario (distintos de Ig) que secretan y los procesos en que participan. Representados en rojo los elementos inflamatorios y en verde los antiinflamatorios. Extraída de (Pioli, 2019).

Como ya se ha mencionado, el MM es una neoplasia que afecta principalmente a estas células inmunitarias (PCs), las cuales, en su estado transformado, migran a lo largo de la médula ósea produciendo, de manera anormal, inmunoglobulina monoclonal (también conocida como proteína monoclonal o M) detectable en fluidos biológicos como sangre y orina (Mitsiades et al., 2004). Además, la elevada tasa de proliferación de las PCs transformadas o células de mieloma múltiple (MMCs) puede llegar a provocar lesiones graves en diversos órganos (como huesos y riñones), como consecuencia de la infiltración de estas MMCs y otros signos como insuficiencia renal, infecciones recurrentes, anemia e hipercalcemia (Cowan et al., 2022).

Esta enfermedad es considerada la segunda neoplasia hematológica maligna más frecuente en Occidente (Mitsiades et al., 2004), con una incidencia a nivel mundial de 6/7 casos por cada 100000 cada año (Gerecke et al., 2016). Es mucho más común en hombres que en mujeres y en poblaciones africanas frente a las caucásicas, presentándose más habitualmente en personas mayores de 40 años. Se trata de un cáncer que no tiene cura actualmente, aunque algunos de los pacientes pueden permanecer en remisión durante años gracias a los tratamientos actuales.

Previamente al desarrollo de la neoplasia, casi la totalidad de los pacientes manifiestan la gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS) (Liu et al., 2020). Es un estado precursor al MM, generalmente asintomático, en que las células tumorales presentan una gran cantidad

de alteraciones genéticas idénticas a las que se encuentran en MM. Puede emplearse como marcador predictivo de la enfermedad ya que las interacciones de las células MGUS con las células inmunitarias, óseas y otras en el nicho de la médula ósea pueden ser reguladores clave de la transformación maligna (Dhodapkar, 2016).

Aunque aún se considera al MM como una sola enfermedad, se trata realmente de un grupo de distintas malignidades de las PCs (Rajkumar, 2019) y, si bien es cierto que no se conoce con exactitud qué eventos son los que llevan a la transformación maligna de los linfocitos B, se conocen diversas mutaciones que se pueden correlacionar con la enfermedad. De entre ellas, las más comunes son trisomías, el reordenamiento del gen IGH; la delección del gen CDKN2C, localizado en el cromosoma 1p y/o la ganancia y amplificación del gen CKS1B, localizado en el cromosoma 1q. Estas mutaciones son consideradas *drivers* de la enfermedad y su presencia en el paciente se relaciona con un mal pronóstico de la misma. Además, se ha visto que las mutaciones en los genes implicados en la vía de señalización de RAS (entre ellos NRAS, KRAS y BRAF) se correlacionan directamente con la progresión y agresividad de la enfermedad, aunque no se sabe a ciencia cierta si las mutaciones en RAS predisponen o llevan a la transformación de las células hacia un fenotipo tumoral (Liu et al., 2020). Asimismo, se conocen muchas otras mutaciones comunes en la mayoría de los pacientes como, por ejemplo, el reordenamiento del gen MYC y las delecciones de los cromosomas 13 y 17p (Rajkumar, 2019).

Actualmente, para el diagnóstico de esta enfermedad se requiere de la detección de un 10% más células plasmáticas clonales en la médula ósea o bien una biopsia que evidencie la presencia de un plasmocitoma óseo o extramedular. Además de esto, también se requiere de la identificación de uno o más eventos definitorios de mieloma (MDE), que son signos que se relacionan directamente con el mieloma múltiple. Entre los MDE se encuentran la hipercalcemia, el fallo renal, la anemia y las lesiones óseas previamente mencionados. Este término también comprende la presencia de biomarcadores específicos que se relacionan con un 80% de riesgo de progresión de la enfermedad: una presencia mayor o igual al 60% de células plasmáticas clonales, una proporción de cadenas ligeras libres mayor o igual a 100 mg/L en suero y la observación varias lesiones focales en una resonancia magnética nuclear (RMN) (Rajkumar, 2019).

También existen parámetros que permiten el diagnóstico de MGUS: la presencia de proteína M en suero (concentración > 3g/mL), presencia de PCs clonales en la médula ósea (<10%) y la ausencia de los daños en órganos característicos del MM (Kyle & Rajkumar, 2009). Dadas las numerosas lesiones genéticas que ya presentan las PCs en la gammapatía, el desarrollo de herramientas de diagnóstico precoz de la enfermedad que detectaran las fases policlonales previas al desarrollo de MGUS podrían favorecer la prevención del desarrollo de MM (Dhodapkar, 2016).

Son múltiples los fármacos existentes para el tratamiento del MM y cada año se desarrollan nuevas opciones. Para el tratamiento del MM de nuevo diagnóstico los grupos de fármacos más empleados son los inmunomoduladores (talidomida y lenalidomida), inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib), anticuerpos monoclonales anti-CD38 (daratumumab e isatuximab), agentes alquilantes (ciclofosfamida/melfalán), corticoides y otros. Los fármacos se eligen según el riesgo del paciente y sus posibilidades de recibir un trasplante autólogo de células madre (ASCT) (Goel et al., 2022).

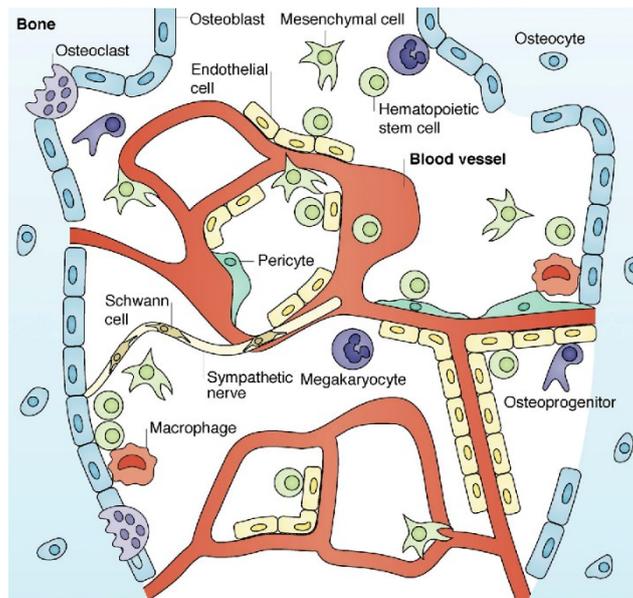
Los pacientes de MM de nuevo diagnóstico que son candidatos para el trasplante, por lo general, se someten a 3 o 4 ciclos de terapia de inducción VRd (bortezomib, lenalidomida, dexametasona), que es la terapia más comúnmente empleada. Si esta terapia no es apta para el paciente, se pueden emplear otros tipos como VTd (bortezomib, talidomida, dexametasona) o VCd (bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona). Tras la terapia de inducción, los pacientes se someten a la recolección de células madre. Después de esto, los pacientes pueden recibir el ATSC o bien pueden retomar la terapia de inducción hasta su recaída, momento en el que se procederá con el ATSC. En el caso de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico que no son candidatos para el trasplante, la terapia VRd (con VCd y VTd como alternativas) se administra de 8 a 12 ciclos, en lugar de 3-4 y, a continuación, se sigue un tratamiento mantenido con lenalidomida.

Desafortunadamente, prácticamente la totalidad de los pacientes sufre una recaída tras el tratamiento inicial. Si es la primera recaída del paciente o si el tiempo de remisión desde el primer ATSC es prolongado, el paciente se considera para una nueva ATSC, siguiendo el mismo tratamiento que un paciente de nuevo diagnóstico, aunque existen combinaciones de fármacos alternativas que han demostrado su eficacia y otros que se pueden emplear en caso de recaídas agresivas.

Dada la baja eficacia a largo plazo de los fármacos actuales y sus efectos secundarios tóxicos para los pacientes, se hace necesario el desarrollo de nuevas terapias para hacer frente a la enfermedad. Una de las investigaciones más prometedoras se centra en el uso de terapia CAR-T (células T receptoras de antígenos quiméricos) contra el antígeno de maduración de las células B (BCMA) (Rajkumar, 2019).

## **1.2. NICHOS BIOLÓGICOS DEL MIELOMA MÚLTIPLE: LA MÉDULA ÓSEA**

La médula ósea (BM, por sus siglas en inglés) es un tejido blando heterogéneo que se encuentra en el interior de las cavidades centrales de huesos largos (como son el fémur, el húmero y la tibia) y en los huesos planos (como el esternón y la cresta ilíaca) (Sebo et al., 2019). Como se muestra en la Figura 3, la BM es un tejido que se encuentra invadido tanto por vasos sanguíneos (arteriolas que atraviesan el hueso y dan lugar a una red de sinusoides que ocupa gran parte del espacio de la BM) como por fibras nerviosas (Lucas, 2021). Asimismo, en este tejido coexisten otros muchos tipos celulares, desde las células del linaje hematopoyético (células mieloides, linfoides y eritroides) hasta adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células madre estromales de la médula y otros (Figura 3). Se pueden distinguir dos zonas en la médula ósea, la médula ósea roja, conformada por las células del linaje hematopoyético y la médula ósea amarilla, que engloba a las células adiposas (con alto contenido graso) además de las células madre mesenquimales (MSC) que se transforman en cartílago, células óseas o adipocitos (Sebo et al., 2019).



**Figura 3.** Esquema de la organización de la médula ósea y sus componentes. Extraída de (Abarrategi et al., 2018).

En la BM se define un microentorno o nicho que es clave para el mantenimiento homeostático de las células madre hematopoyéticas (HSC) así como las células progenitoras hematopoyéticas (HSPC). En este nicho, las HSC y las HSPC se encuentran interactuando tanto con el resto de los tipos celulares se encuentran formando parte de la médula como las MSC, los osteoblastos, etc.; como con distintos factores acelulares como la matriz extracelular (MEC), los factores solubles, etc. Esta interacción les proporciona señales a las células hematopoyéticas que les servirán como indicación para su proliferación, diferenciación y renovación. Además de la interacción indirecta a través de factores solubles, se ha visto que también se dan interacciones directas o adhesivas entre las células hematopoyéticas y el nicho en que se encuentran (tanto interacciones célula-célula como célula-MEC). A pesar de que en algunos casos no se tiene claro cómo se dan estas interacciones y cuáles son sus efectos, se sabe que esta interacción es clave, no solo para el desarrollo normal de las células, sino también para la supervivencia, resistencia frente a los fármacos, proliferación y progresión del MM (Klamer & Voermans, 2014).

De este modo, el desarrollo del MM no viene dado tan solo por las alteraciones genéticas que se dan en las PCs, sino también por la relación bidireccional de las MMCs (PCs transformadas) con el nicho en el que se encuentran. Así, las células tumorales alteran la homeostasis del hueso, causando las lesiones previamente mencionadas y el microentorno les proporciona a las células cancerosas protección contra el sistema inmunitario. También se ha visto que la interacción con estas activa una cascada de vías de señalización que promueven la proliferación celular o que tienen un efecto antiapoptótico, promoviendo, por tanto, la progresión de la enfermedad. Dentro de estas vías se incluyen JAK/STAT3, Ras, Raf y MAPK (Mitsiades et al., 2004)

En este trabajo se pone el foco en el efecto que tiene sobre las progresión del MM, la adhesión directa de las MMCs a la MEC y a las MSC humanas (hMSCs) y la interacción indirecta a través de factores solubles (como IL-6 o IL-10) entre MMCs y hMSCs. Por tanto, se estudian los efectos tanto de los elementos acelulares como de los elementos celulares del nicho de la BM sobre la enfermedad del MM.

### 1.2.1. COMPONENTE ACELULAR

La MEC de la BM está producida por las células del nicho y es capaz de interactuar con distintos tipos de moléculas, incluidas las proteínas de membrana de las células. Las proteínas más abundantes de la MEC en la BM son fibronectina, colágenos I-XI, laminina, tenascina, trombospodina y elastina; aunque también están presentes proteoglicanos que presentan glicosaminoglicanos (GAGs) en sus cadenas laterales como ácido hialurónico (HA), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato y heparina (Hep). Estos proteoglicanos son fundamentales para mantener la integridad de la MEC. Además de todos estos elementos, la MEC presenta otras moléculas asociadas como glicoproteínas. De entre los compuestos de la MEC, en este trabajo se estudia el efecto de cuatro de ellos: Hep, CS, colágeno I (Col I), y HA (Klamer & Voermans, 2014).

El CS es un GAG sulfatado compuesto de unidades repetitivas del ácido D-glucurónico uno a  $\beta$ -N-acetil-galactosamina. Existen diversos subgrupos de CS dependiendo de la posición del grupo sulfato. La interacción de la ECM con las MMCs está mediada, en este caso, por selectinas, integrinas, moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1) (Clara-Trujillo et al., 2020).

La Hep es un GAG presente en la ECM y en el glicocáliz de las células. Está formado por repeticiones de D-glucosamina y D-ácido glucurónico muy sulfatados. Gracias a su estructura puede interactuar con numerosos factores solubles como son las IL o los factores de crecimiento que liberan tanto las MMCs como las hMSCs en el transcurso de la enfermedad del MM. Esto le permite modular una gran cantidad de rutas metabólicas que favorecen la progresión de la enfermedad (Kibler et al., 1998).

El HA es el GAG no proteico principal de la MEC en la BM de mamíferos. Se trata de un polímero aniónico de alto peso molecular que forma una capa pericelular hidratada la cual tiene un papel clave en la interacción de las células con el microambiente. De hecho, puede activar vías de señalización intracelular a través de diversos receptores de superficie, siendo los más relevantes CD44 y RHAMM. Se ha visto que tiene un papel fundamental en la fisiopatología del MM, puesto que actúa como factor de supervivencia y proliferación. También se ha determinado que, durante el desarrollo de la enfermedad, las hMSCs aumentan la síntesis de este GAG. En el caso de las MMCs RPMI8226, se ha visto que el HA señala por una vía independiente a la IL-6, aunque también puede actuar mediante vías dependientes de esta IL (Vincent & Mechti, 2005).

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y es uno de los compuestos más abundantes de la MEC, siendo el Col I el más abundante de todos los tipos de colágeno. El Col I es un heterotrímero formado por dos cadenas  $\alpha$ 1 y una cadena  $\alpha$ 2. La interacción entre MMCs y Col I se da mediante una familia de proteoglicanos integrales de membrana llamados sindecanos, en concreto, mediante sindecano-1. Esta interacción se asocia con la activación de señalización (Wnt/  $\beta$ -catenina) que promueve la proliferación, diseminación y progresión de la enfermedad (Marín Payá J. C., 2020).

### 1.2.2. COMPONENTE CELULAR

El componente celular de la BM que se estudia en el presente trabajo son las hMSCs, y su interacción con las MMCs. Esta interacción se da tanto de forma directa, mediada por moléculas de adhesión, como indirecta, mediada por citoquinas y factores que liberan ambos tipos celulares.

Los factores que se liberan promueven la proliferación y supervivencia de las MMCs y pueden ser tanto paracrinos como autocrinos. Entre ellos se incluyen interleucina-6 (IL-6), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor 1 derivado del estroma (SDF-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o miembros de la familia Notch.

Todos estos factores liberados por las hMSCs inducen efectos variados sobre las MMCs, pero el resultado final de la interacción es la progresión de la neoplasia. Por ejemplo, IL-6, IL-1 y VEGF promueven la osteoclastogénesis; el TNF- $\alpha$  modula los perfiles de las moléculas de adhesión entre las MMCs y las hMSCs; el SDF-1 promueve la adaptación de las MMCs a la BM; los IGF y su receptor en las MMCs, el IGF-R1, contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad ya que activan de forma prolongada la señalización proliferativa y antiapoptótica de las MMCs (entre ellas, las actividades de la telomerasa y del proteasoma) promueve la resistencia a fármacos (como la quimioterapia) y estimula la respuesta de las MMCs a otras citocinas como la IL-6; la IL-6, por su parte, también tiene un efecto activador de cascadas de señalización que promueven la proliferación celular (activando a RAS, Raf/MEK-ERK) y de cascadas inhibitorias de la apoptosis. Esta IL ha demostrado ser clave en la interacción entre MMCs y hMSCs y en la supervivencia tumoral, siendo un factor de mal pronóstico para los pacientes (Mitsiades et al., 2004).

No solo las hMSCs secretan factores solubles en su interacción con las MMCs, sino que las células tumorales también son capaces de secretarlos. Un ejemplo es la IL-10, otro de los elementos clave en la progresión del MM y es que esta citoquina promueve tanto la angiogénesis como la proliferación de las propias MMCs; además, es capaz de modular la respuesta antitumoral del huésped mediante la activación de diversas vías de señalización. También se ha visto que el papel de IL-10 es fundamental en el desarrollo de resistencia a quimioterapia en otros tipos de cáncer, lo que lleva a pensar que también presenta un papel clave en el MM (Wang et al., 2016).

Como se ha mencionado, dichas interacciones promueven la resistencia a fármacos y la progresión del tumor, lo que lleva, en la mayoría de casos, a un fatal desenlace para los pacientes de MM debido al fracaso de las terapias actuales (Mitsiades et al., 2004). Es por ello por lo que es necesario seguir investigando, desarrollando nuevos modelos de cultivo *in vitro* que repliquen el nicho de la BM en que se desarrollan las MMCs. La inclusión de los elementos del microambiente tumoral necesario para entender las interacciones que causan el fallo de las terapias actuales y para poder desarrollar nuevos fármacos que permitan erradicar la enfermedad.

### 1.3. MODELOS DE ENFERMEDAD *IN VITRO*

El mieloma múltiple es, por tanto, una enfermedad dinámica, que está influenciada, no solo por las propias MMCs, sino por el microentorno de la BM que incluye tanto factores celulares como acelulares y que pueden ser clave para determinar el curso de la enfermedad.

Los cultivos celulares convencionales están basados en modelos 2D y en modelos animales. Sin embargo, estos modelos presentan ciertas limitaciones a la hora de su aplicación. Por ejemplo, un modelo 2D no permite recrear con fidelidad el nicho de la BM, el cual es clave para la progresión de la enfermedad, así como para la resistencia a los fármacos que desarrollan las MMCs. Se pierden, por tanto, las interacciones directas e indirectas entre los distintos tipos celulares que se encuentran en el microambiente y entre estos y la MEC. Se ha visto que la falta de estas interacciones causa cambios a nivel de expresión de las MMCs, además de cambios de sensibilidad frente a fármacos.

Por su parte, un modelo animal presenta diferencias biológicas con los humanos, por lo que sus procesos biológicos serán diferentes y esto impedirá que el modelo sea una fiel representación de lo que sucede en humanos. Aunque se ha conseguido humanizar ratones para con fines científicos, su uso para la investigación del MM sigue siendo un reto. Por todos estos motivos, la mayoría de los fármacos candidatos estudiados en modelos animales, no tienen éxito en su traslado a la clínica (Clara-Trujillo et al., 2020).

En cambio, se ha visto que los cultivos 3D de esferoides multicelulares son capaces de replicar mucho más fielmente el microentorno de las MMCs de lo que lo hacen cultivos 2D. De esta manera, la expresión génica y la sensibilidad de las células tumorales frente a los fármacos son mucho más parecidos a lo que sucede *in vivo*, siendo un modelo de enfermedad mejorado frente a los modelos convencionales. Estos modelos 3D no solo permiten a las MMCs interactuar con otras células que pertenecen a su microentorno, sino que ofrecen la posibilidad de que las células transformadas interactúen con los elementos de la MEC dado que estos se pueden incluir al entorno de diversas formas (andamiajes, microesferas, etc.) (Riedl et al., 2017).

Los modelos de cultivo *in vitro* 3D de MM probados hasta ahora comprenden múltiples aproximaciones donde se incluyen distintas biomoléculas presentes en la MEC (incorporados mediante materiales de andamiaje biomiméticos) y distintos tipos celulares que interactúan con las MMCs *in vivo* como son las HSC o las MSCs. Pese a los esfuerzos, aún no hay ningún estándar establecido que represente con total fidelidad la complejidad del nicho de la BM ya que, por el momento, solo se han logrado reproducir *in vitro* algunos aspectos particulares de este nicho.

Por todo esto, es necesario seguir investigando y desarrollando nuevos modelos de cultivo *in vitro* 3D que repliquen de la manera más fiel y completa el microentorno de la BM en que se desarrollan las MMCs. La inclusión de los elementos del microambiente tumoral necesario para entender las interacciones que causan el fallo de las terapias actuales y para poder desarrollar nuevos fármacos que permitan erradicar la enfermedad (Clara-Trujillo et al., 2020).

## 2. OBJETIVOS

Frente a la imperiosa necesidad del desarrollo de una plataforma de cultivo *in vitro* 3D del MM para poder testar los fármacos actuales y entender así por qué las terapias fracasan, se establecen los siguientes objetivos en el presente trabajo:

- Elaboración de microesferas (microgeles) biomiméticas mediante el uso de un sistema de microfluídica.
- Funcionalización superficial de las microesferas mediante la técnica Layer by Layer (LbL) con componentes propios de la MEC de la BM como son el CS, la Hep y el HA y el injerto de Col I sobre el recubrimiento producido por LbL.
- Caracterización morfológica de las microesferas sin recubrir y caracterización bioquímica del recubrimiento.
- Validación de la plataforma de cultivo de MMCs desarrollada que combina los microgeles biomiméticos fabricados y caracterizados con el co-cultivo de hMSCs. Los ensayos de viabilidad, proliferación y ciclo celular permiten estudiar los efectos de ambos componentes (microesferas y hMSCs) sobre las MMCs.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIALES

Para la fabricación de las microesferas magnéticas de alginato (MO) se emplean aceite de oliva virgen extra comercial (La Masía) así como lecitina de soja, alginato de sodio de alga marrón (Alg), carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) y ácido acético, todos ellos de Sigma-Aldrich. También se usa agua miliQ, nanopartículas magnéticas de ferrita de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Ferrotec), etanol 98% y cloroformo (Scharlab).

Para la funcionalización de las microesferas mediante layer by layer (LbL) se emplea poli-L-lisina hidrobromida, condroitín sulfato de cartílago de tiburón, sal sódica de ácido hialurónico de *Streptococcus*, heparina, N-hidroxisuccinimida (NHS) glicina (Gly) todos ellos de Sigma Aldrich, cloruro cálcico anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ; PANREAC) y N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC; Iris Biotech GmbH). El colágeno I de bovino que se emplea para las funcionalizaciones es de PureCol y glutaraldehído (GA; Scharlab). También se emplean ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), ambos de Scharlab, para el ajuste de pH.

Para la caracterización morfológica de las microesferas de alginato se emplea el microscopio invertido Nikon Eclipse TS100-F. Para la caracterización bioquímica, se realizan diversas cuantificaciones de diferentes biopolímeros. Para ello, se emplean el kit B1000 Blyscan (Bicolor), trans-hidroxi-L-prolina (Fluka), ácido cítrico monohidrato, trihidrato de acetato de sodio, acetato de sodio anhidro, isopropanol, cloramina T, ácido perclórico, 4-(dimetilamino)benzaldehído, acetato de litio dihidrato, ninhidrina, hidrindantina y etilenglicol (todos de Sigma-Aldrich). Como en todos los ensayos se ha de medir la absorbancia en el espectrofotómetro de placas Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector, empleando placas multipocillo p96 no tratadas (FALCON).

En el cultivo celular se emplean dos líneas celulares comerciales, las células madre mesenquimales de la médula ósea humanas (PromoCell, Heidelberg, Alemania) y las células de mieloma múltiple RPMI 8226 (ATCC). Para las distintas fases del cultivo celular de ambas, se usan medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con y sin rojo fenol (Sigma-Aldrich), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 suplementado (Promocell). Para complementar los medios, se añaden suero bovino fetal (FBS), penicilina-estreptomicina (P/S) (Fisher), tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) y L-glutamina (L-Glut) de Lonza. En el cultivo celular se emplean agarosa (Sigma-Aldrich), flascos adherentes de 75cm<sup>2</sup> (T75; SPL LIFE SCIENCES) y no adherentes de 25cm<sup>2</sup> (T25; FLACON), placas multipocilo p12 no tratadas (FALCON) y Cytodex® 1 microcarrier beads (Sigma-Aldrich).

Para los ensayos celulares se emplean el MTS assay kit y el kit de ciclo celular basado en Yoduro de Propidio (PI) de ABCAM, así como el kit de ciclo celular basado en Annexin V-FITC y los marcadores CD73 antibody anti-human-APC; CD90 antibody anti-human-FITC; todos de Miltenyi Biotec y CD138 anti-human (BD Biosciences) y placas multipocillo P96 no tratadas (FALCON).

## **3.2. SÍNTESIS DE MICROESFERAS MAGNÉTICAS DE ALGINATO**

### **3.2.1. DISOLUCIONES**

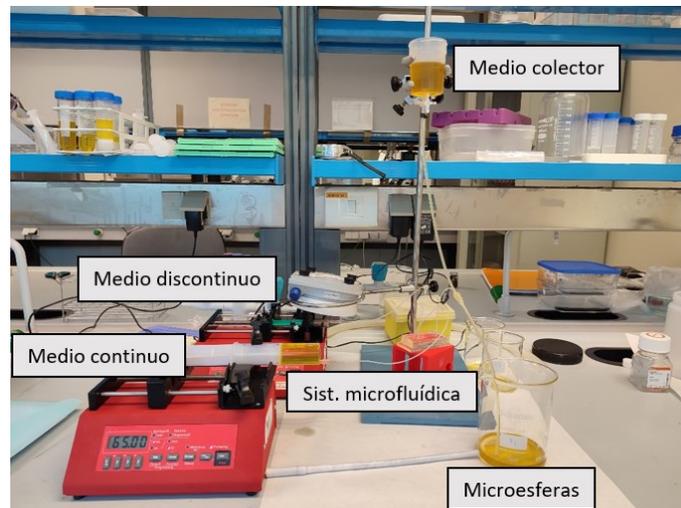
Para la síntesis de las microesferas se han de preparar las distintas soluciones que convergen dentro del sistema de microfluídica y a su salida. Las composiciones de estos son:

- Medio continuo (MC): formado por lecitina de soja (1% p/p) en aceite de oliva virgen extra.
- Medio discontinuo (MD): formado por alginato de sodio (1,5% p/v), nanopartículas de ferrita de hierro (5% p/p de alginato) y CaCO<sub>3</sub> (0,25M), todo disuelto en agua.
- Medio colector (MCol): compuesto por aceite de oliva virgen extra con lecitina de soja (1% p/p) y ácido acético (2% v/p de aceite con lecitina).

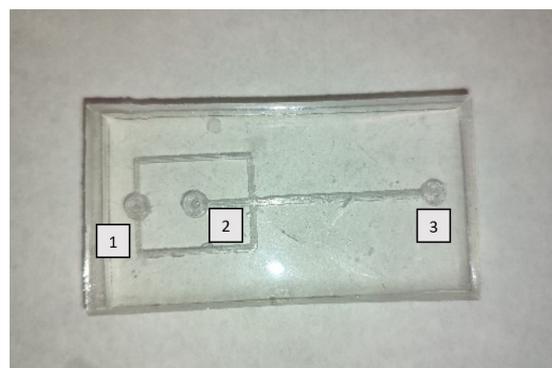
Los dos medios oleosos se preparan y homogenizan en el agitador magnético a temperatura ambiente. Para el medio acuoso, la elaboración es diferente. Primero se preparan dos disoluciones de igual volumen de alginato de sodio en agua miliQ (3% p/v) que se deja en agitación magnética con control de temperatura (50-100 °C) al menos una hora o hasta su completa disolución. Mientras el alginato se disuelve, se prepara una suspensión de CaCO<sub>3</sub> en agua miliQ (0,5 M) que se dispersa en el baño de ultrasonidos un tiempo mínimo de media hora. Transcurrido este tiempo, se integran las disoluciones que se dejan en agitación, al menos, otra media hora. Durante este lapso, se pesan las nanopartículas de ferrita de hierro y se dispersan en un volumen pequeño de etanol en el baño de ultrasonidos para añadirla, posteriormente, a la disolución de alginato y CaCO<sub>3</sub>. Toda la mezcla se debe homogeneizar durante al menos 4h mecánicamente en el Ultraturrax.

### 3.2.2. MICROESFERAS

La síntesis de microesferas magnéticas de alginato (MO) sigue el protocolo empleado en (García-Briega et al., 2022) con ligeras modificaciones. El montaje empleado para su obtención se muestra en la Figura 4. El MD se introduce en una jeringa de 6 mL y 12,3 mm de diámetro de émbolo y el MC se introduce en una jeringa de 60 mL y 26 mm de diámetro de émbolo. Ambas jeringas se conectan a tubos de silicona mediante agujas que por la salida conectan con tubos y finalmente con las entradas 1 (MC) y 2 (MD) del sistema de microfluídica (Figura 5). Para impulsar los MC y MD se emplean bombas de jeringuilla, con caudales de 60 mL/h y 1,55mL/h respectivamente. Para mantener las nanopartículas de ferrita en suspensión durante el proceso, se sitúa encima de la jeringuilla de MD un agitador orbital magnético. Por su parte, el MCoL está en un vaso desde el que fluye hacia la salida del sistema aprovechando la gravedad (Figura 4). Luego confluyen el flujo de microgotas salidas del sistema y el flujo de MCoL de forma coaxial hasta llegar al vaso recolector.



**Figura 4.** Sistema de síntesis de microesferas. Se muestra el medio continuo, discontinuo, colector, el sistema de microfluídica y las microesferas.



**Figura 5.** Sistema de microfluídica. El punto 1 sirve de entrada para el medio continuo, el 2 para el discontinuo y el 3 para la salida de microesferas y su recogida gracias al medio colector.

Una vez realizado el montaje, se inicia la síntesis de las microesferas. En la intersección de los canales que llevan el MD y el MC (Figura 5) la inmiscibilidad de ambos provoca que el MD se separe en microgotas que salen del sistema de microfluídica por un tubo conectado a la entrada 3 (Figura 5). En este punto las microgotas aún no están reticuladas, pero cuando se encuentran

en el tubo coaxial con el MCol (que presenta ácido acético) permite que se disocie el  $\text{CaCO}_3$  del interior de las microesferas, liberando iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos iones catiónicos reticulan las cadenas de alginato que forman las microesferas, manteniéndolas unidas iónicamente y de manera estable. A la salida del tubo coaxial, las microesferas ya están reticuladas y pueden ser recogidas.

Para limpiar el aceite de las microesferas y almacenarlas hasta su posterior uso, se realizan diferentes lavados en una campana de gases. Primero se elimina la mayor parte del MC y MCol recogido en el vaso colector por decantación. Cuando la cantidad de aceite se haya reducido, se hace pasar la mezcla de aceite y microesferas por un tamiz de  $60\ \mu\text{m}$  (Pluriselect) para mantener exclusivamente las microesferas. A continuación, se realizan lavados consecutivos con cloroformo hasta eliminar todo el aceite y lavados con agua para eliminar el cloroformo. Finalmente, las microesferas se autoclavan para asegurar su esterilidad y almacenan en agua miliQ.

### **3.3. FUNCIONALIZACIÓN DE MICROESFERAS POR LAYER BY LAYER (LbL)**

Para la funcionalización de las microesferas de este trabajo se ha escogido la técnica de Layer by Layer del tipo inmersiva (Kamali & Ghahremaninezhad, 2018). Se aprovecha la carga negativa superficial de la microesfera de alginato para iniciar el recubrimiento con un polielectrolito positivo, que es la PLL. A continuación, se gestionan diferentes pares de polielectrolitos de cargas opuestas, que se atraen mutuamente y consolidan las diferentes capas para generar una cubierta de 6 capas de grosor. Esta cubierta ofrece en su superficie biomoléculas de interés de la MEC (HA, Hep, CS y Col I). Es relevante destacar que el proceso de funcionalización es el mismo para los pares PLL/HA, PLL/CS y PLL/Hep debido a que el CS, HA y la Hep son polielectrolitos negativos. Sin embargo, como el Col I es de carga positiva, el proceso para esta funcionalización es diferente. Asimismo, remarcar que todas las funcionalizaciones se realizan tras autoclavar las microesferas, es decir, en condiciones de esterilidad y empleando elementos estériles o desinfectados. Las microesferas recubiertas se muestran en el apartado 7.2 (anexo).

#### **3.3.1. LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y CONDROITÍN SULFATO (LbL PLL/CS)**

El protocolo seguido para este par consiste en recubrir las MO de un total de tres bicapas de los polielectrolitos PLL (positivo) y CS (negativo) como se muestra en la Figura 6. Para ello, se hace uso de un agitador rotacional PTR-35 (Grant-Bio) en todos los pasos de inmersión o lavado que minimice la formación de agregados entre las microesferas, a la vez que se obtiene una correcta envoltura por toda la superficie de todas las microesferas.

Primero, se preparan las soluciones del LbL: La solución de PLL se prepara a una concentración de  $0.5\ \text{mg/mL}$  en agua miliQ y con  $75\ \text{mL}$  de  $\text{CaCl}_2$ . La solución de CS se prepara a  $1\ \text{mg/mL}$  en agua miliQ y con  $75\ \text{mL}$  de  $\text{CaCl}_2$ . En ambas disoluciones se ha de homogeneizar la solución durante mínimo 1 hora. El agua de lavado consiste en  $\text{CaCl}_2$  al  $75\ \text{mM}$  en agua miliQ. Los pH de las tres disoluciones han de ser ajustados a 7 empleando soluciones de NaOH y HCl de baja molaridad. Finalmente, la solución de entrecruzamiento consiste en una disolución de EDC  $60\ \text{mM}$ , NHS  $30\ \text{mM}$  y  $\text{CaCl}_2$   $75\ \text{mM}$  en agua miliQ que se debe homogeneizar un mínimo de 2 h y

no requiere de ajuste de pH. Antes de su uso en el recubrimiento, estas soluciones hay que filtrarlas con filtros PES de 0.22  $\mu\text{m}$  estériles.

Para comenzar con la funcionalización, se recuperan las microesferas del recipiente en el cual fueron autoclavadas con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, un tamiz celular estéril de 70  $\mu\text{m}$  y un pincel de silicona previamente autoclavado. Se han de recuperar entre 1 y 2 mL de microesferas para mantener siempre un ratio controlado de líquido y microesferas de 10:1.5 aproximado. Tras ello, las MO se transfieren a un recipiente Falcon de 15 mL con agua el agua de lavados, que se puede cerrar herméticamente y agitar rotacionalmente durante 30 minutos.

Una vez realizado el acondicionamiento de las microesferas, estas se recogen igual que antes, con el tamiz celular, la pipeta Pasteur y el pincel de silicona. Retirada el agua, las microesferas se transfieren a otro Falcon de 15 mL que contiene la solución de PLL filtrada. Se agita el Falcon en el agitador rotacional durante 10 minutos para permitir que todas las microesferas entren en contacto con la solución. Tras este tiempo, se retira la PLL del Falcon con una pipeta Pasteur y reteniendo las microesferas magnéticas con un imán de niobio. Se reserva el polielectrolito para usos posteriores y se resuspenden las microesferas en agua de lavados, donde se lavan los posibles restos de PLL durante 10 minutos. A continuación, como se realiza un cambio de polielectrolito, se recoge toda la suspensión de microesferas y agua en el tamiz, descartando el agua de lavados. Estas microesferas se transfieren a otro Falcon que contiene la solución de CS y se deja en agitación 10 minutos. Tras ello, con ayuda del imán, se retira y reserva la solución de CS y se sustituye esta solución por agua de lavados, que limpia las microesferas durante 10 minutos. Este proceso se repite dos veces más para obtener un total de tres bicapas de recubrimiento de PLL/CS.

Tras el último lavado de la última bicapa se tamizan de nuevo las MO y se transfieren a un Falcon que contiene la disolución entrecruzadora EDC/NHS. Se dejan las microesferas embebidas en esta solución "overnight" en agitación y, al día siguiente, se realizan dos lavados con agua de lavados tal y como se ha explicado de 15 minutos cada uno para eliminar correctamente la solución de entrecruzado. Finalmente, se almacenan las microesferas en agua miliQ y condiciones estériles en la nevera (4 °C) hasta su posterior uso.

De esta manera, el esquema general del procedimiento es el siguiente: Agua de lavados-PLL- Agua de lavados-CS- Agua de lavados-PLL- Agua de lavados-CS- Agua de lavados-PLL- Agua de lavados-CS- Agua de lavados-EDC/NHS- Agua de lavados- Agua de lavados.

### **3.3.2. LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y HEPARINA (LbL PLL/Hep)**

El LbL-Hep consiste en recubrir las microesferas de alginato de un total de tres bicapas de los polielectrolitos poli-L-lisina (positivo) y heparina (negativo) como se muestra en la Figura 6. Para ello, se han de preparar una solución de PLL, una de Hep, una de agua de lavado y la solución de entrecruzamiento EDC/NHS. Las concentraciones son las mismas empleadas en el PLL/CS, sustituyendo la solución de CS por la de Hep y ajustando el pH a 5,5.

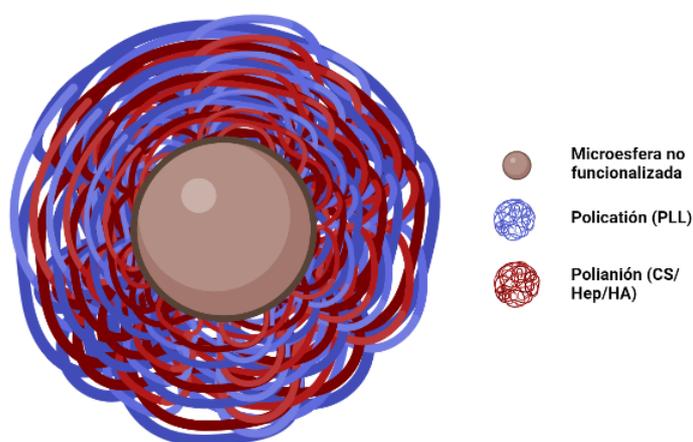
El procedimiento llevado a cabo para el LbL PLL/Hep es también el mismo que el de PLL/CS. De manera que el esquema general del proceso es: Agua de lavados-PLL- Agua de lavados-Hep- Agua

de lavados-PLL-Agua de lavados-Hep-Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-Hep-Agua de lavados-EDC/NHS-Agua de lavados-Agua de lavados.

### 3.3.3. LAYER BY LAYER DE POLI-L-LISINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO (LbL PLL/HA)

El LbL-HA consiste en recubrir las microesferas de alginato de un total de tres bicapas de los polielectrolitos poli-L-lisina (positivo) y ácido hialurónico (negativo) como se muestra en la Figura 6. Para ello, se han de preparar una solución de PLL, una de HA, una de agua de lavado y la solución de entrecruzamiento EDC/NHS. Las concentraciones son las mismas empleadas en el LbL-CS, sustituyendo la solución de CS por la de HA y ajustando el pH a 5,5.

De esta manera, el esquema general del proceso es: Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-HA-Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-HA- Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-HA-Agua de lavados-EDC/NHS-Agua de lavados-Agua de lavados.



**Figura 6.** Microesfera funcionalizada mediante el procedimiento LbL con el poliacrilato PLL y el polianión que puede ser CS, Hep o HA. Creado con BioRender.com

### 3.3.4. LAYER BY LAYER DE COLÁGENO (LbL Col I)

Para el LbL Col I el procedimiento consiste en recubrir las microesferas de dos bicapas y media (es decir, dos bicapas PLL/CS completas y una última capa consistente únicamente en PLL) a las cuales se les realiza un injerto de colágeno I (Figura 7).

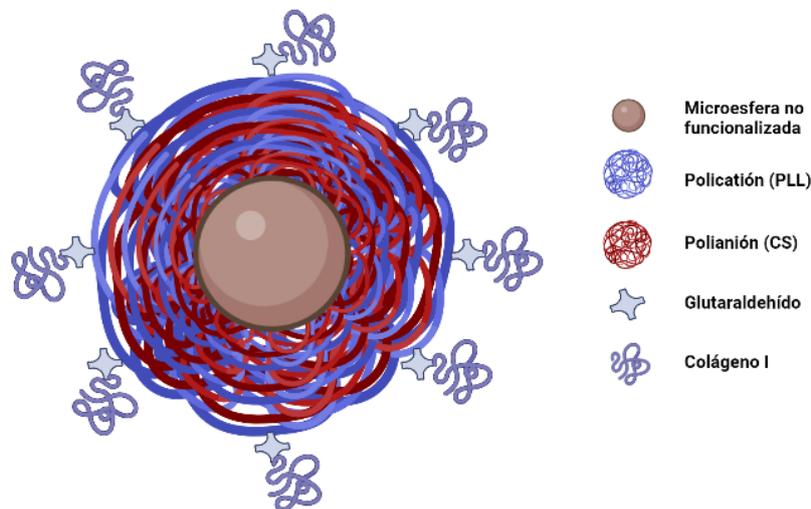
Para ello, se han de preparar las mismas disoluciones de PLL, CS y agua de lavados que se preparan en el LbL PLL/CS, a las mismas concentraciones y pH. Además, se han de preparar las disoluciones de glutaraldehído, colágeno I y glicina.

La solución de GA consiste en diluir al 0,5 p/v en agua miliQ el GA comercial (al 25% p/v). La solución de glicina consiste en 0.2 M de gly en agua miliQ y se deja agitar 20 minutos. Ambas disoluciones han de prepararse el mismo día de su uso y han de filtrarse con un filtro PES previamente. Para obtener la solución de colágeno I a 1 mg/mL se diluye la disolución Col I 3 mg/mL comercial que es estéril. Para esto, y con el fin de mantener el pH ácido característico del colágeno I, se usa "agua ácida", que es agua de lavados con ácido acético 0.2 M. Se filtra este

agua ácida y se mezclan en estéril los volúmenes que correspondan de Col I 3 mg/mL y agua ácida para obtener la concentración final deseada de 1 mg/mL.

El proceso de recubrimiento es idéntico al LbL PLL/CS hasta la obtención de dos bicapas y media, es decir, un total de dos bicapas PLL/CS y una última capa de PLL. Tras esta última capa y su correspondiente lavado se sumergen las microesferas en la solución de GA en un recipiente cerrado que se deja en agitación 1 hora. Este componente es esencial para permitir injertar el colágeno I sobre la capa de PLL gracias a que une uno de sus grupos aldehído a los grupos amina de la PLL y deja el otro expuesto para unir el Col I. A continuación, se tamizan las MO, desechando el GA y recuperando las microesferas en un nuevo recipiente con agua de lavados durante 10 minutos. Se realiza un segundo lavado con agua de otros 10 minutos para eliminar debidamente el GA no unido a las microesferas. Tras ello, se transfieren las microesferas a un Falcon con la solución de Col I y se deja agitando overnight en el biorreactor. Al día siguiente, se elimina la solución de colágeno I y se lavan las microesferas con agua de lavados durante 10 minutos dos veces. Tras los lavados, se incorpora la solución de glicina a las microesferas, dejándolo en agitación "overnight". Este paso permite inactivar los radicales aldehídos no reaccionados del GA que hayan podido quedar, evitando así su efecto citotóxico sobre las células. Al día siguiente se retira la solución de Gly y se realizan dos lavados consecutivos con agua de lavados en agitación orbital. Finalmente, las microesferas se transfieren a un Falcon con agua miliQ para su almacenaje en condiciones estériles a 4 °C hasta su uso.

El esquema final del procedimiento es el siguiente: Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-CS-Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-CS- Agua de lavados-PLL-Agua de lavados-GA-Agua de lavados-Col I-Agua de lavados-Gly-Agua de lavados-Agua de lavados.



**Figura 7.** Microesfera funcionalizada mediante el procedimiento LbL con el poliacrilato PLL, el polianión CS y el injerto de Col I mediante el GA. Creado con BioRender.com

### 3.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA: MICROSCOPIA ÓPTICA

Para observar tanto la forma, como la distribución de tamaños y el diámetro de las microesferas, se emplea el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100-F, al cual se integra una cámara fotográfica. Las microesferas se han de embeber en agua y disponer sobre una superficie lisa

para la captura de las imágenes. Tras la obtención de estas, se emplea el software “ImageJ” para obtener el diámetro de las microesferas y, puesto que su forma no es completamente esférica, se emplea el diámetro de Feret para su análisis, ya que ofrece un valor más real de los diámetros. Posteriormente se transfieren los datos a Excel para su análisis.

### **3.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS MICROESFERAS Y SUS FUNCIONALIZACIONES**

#### **3.5.1. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

El FTIR es una técnica basada en espectroscopía que, gracias a la radiación en el espectro del infrarrojo, proporciona información acerca de los grupos funcionales, tipos de enlaces y conformaciones moleculares de la muestra a analizar (Movasaghi et al., 2008). Esto se debe a que los picos que aparecen en los espectros de vibración generados en el análisis son específicos de cada molécula, proporcionando así información de la composición bioquímica de la muestra. Por lo que, pese a que no permite la cuantificación de los diversos componentes, si permite demostrar de forma cualitativa la efectividad del método LbL.

El equipo empleado para el ensayo es el espectrómetro ALPHA FT-IR (Bruker) que permite analizar el espectro desde la longitud de onda  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta los  $400\text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras analizadas son todos los tipos de microesferas de alginato fabricadas, es decir, microesferas recubiertas mediante LbL PLL/CS, Col I, PLL/Hep y PLL/HA.

Los datos obtenidos del espectrofotómetro se transfieren a una hoja de Excel para su representación y análisis. Teniendo en cuenta que los valores de transmitancia carecen de unidades, a cada espectro se le suma un valor fijo para desplazarlo en el eje y. Esto evita la superposición de los distintos espectros y facilita su visualización y estudio sin modificar su forma.

#### **3.5.2. BLYSCAN**

El Blyscan es un ensayo que permite determinar la cantidad de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados presentes en una muestra. Lo que se mide es el cambio de color en el reactivo 9-dimetil-metileno en función de la cantidad de grupos sulfato presentes en estos GAGs. Para la realización del ensayo se sigue el protocolo del fabricante del kit “Glycosaminoglycan Assay Blyscan” (Ltd, 2010), tras lo cual se mide la absorbancia del sobrenadante resultante mediante el Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector a una longitud de onda de 652 nm.

Las muestras analizadas son, por tanto, las microesferas con GAGs sulfatados, que son las MO PLL/CS y PLL/Hep y, como control, se emplean las microesferas sin recubrir. Los resultados obtenidos se analizan en Excel, permitiendo cuantificar, de forma específica para el CS y la Hep, la cantidad retenida en las microesferas mediante el procedimiento de LbL.

### **3.5.3. HIDROXIPROLINA**

La cuantificación de la hidroxiprolina se emplea para cuantificar colágeno debido a que este aminoácido solo está presente en el colágeno y sus derivados de forma natural, puesto que se produce al metabolizar esta biomolécula en el cuerpo. El procedimiento seguido en este análisis se basa en el desarrollado por Kafienah y Sims, 2004 (Kafienah & Sims, 2004). Primero es necesaria la hidrólisis ácida del colágeno y después se realiza el ensayo colorimétrico de cuantificación de hidroxiprolina. En este procedimiento, la hidroxiprolina se convierte en pirrol que reacciona con el 4-dimetilaminobenzaldehído o reactivo de Ehrlich, dando lugar a un compuesto que absorbe a 570 nm (Da Silva et al., 2015), permitiendo así cuantificar el colágeno presente en una muestra mediante una equivalencia de hidroxiprolina:colágeno de 1:7.69.

Para ello, se han de preparar muestras de microesferas sin recubrir y recubiertas con todo menos el colágeno a modo de control y en microesferas recubiertas mediante LbL Col I para comprobar la correcta deposición de la biomolécula.

### **3.5.4. NINHIDRINA**

El ensayo de ninhidrina permite la determinación cuantitativa de aminas primarias en una muestra gracias a un cambio colorimétrico. Este color viene dado por el compuesto dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina o Púrpura de Ruheman que resulta de la reacción de la ninhidrina con los grupos amina y se mide a 570 nm (Leane et al., 2004) con el equipo Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector. El protocolo empleado para la realización de este ensayo se basa en el de Algieri *et al.*, 2017 (Algieri et al., 2017).

El ensayo se va a emplear para demostrar la deposición de HA de forma semicuantitativa en las microesferas con el recubrimiento PLL/HA. Esto es así ya que no se ha podido encontrar un método de detección exclusivo de HA sin que influya el interior de alginato de la microesfera o las capas del policapación (PLL). Se emplea, por tanto, la deposición de PLL (cadena de lisinas) en cada una de las bicapas como demostración de que el LbL funciona. Para ello, se emplean microesferas magnéticas como control negativo, y MO recubiertas con 1, 2 y 3 bicapas de LbL PLL/HA.

## **3.6. CULTIVO CELULAR**

### **3.6.1. FABRICACIÓN DEL POCILLO DE CULTIVO**

Para el desarrollo del cultivo en estático es necesario emplear un soporte de cultivo permeable que permita el intercambio de factores solubles entre las hMSCs y las MMCs tanto de manera directa como de manera indirecta. Además, es necesario este soporte presente unos pocillos de volumen suficiente como para albergar tanto los microgeles, como las MMCs y los pellets de hMSCs. Es por ello por lo que se han desarrollado unos hidrogeles cúbicos y con 4 pocillos cónicos cada uno de ellos que sirven de plataforma de cultivo (Figura 8).

Los soportes de cultivo se fabrican empleando una solución de agarosa al 1,5% p/v en agua miliQ que es autoclavada antes de la fabricación de los geles. Se elige la agarosa por su

entrecruzamiento físico, que permite darle forma al soporte empleando diferentes moldes fabricados por los compañeros Joaquín Ródenas Rochina, María Inmaculada García Briega y Luís Amaro Martins en el CBIT, sin añadir reacciones químicas al proceso. La agarosa calentada se vierte sobre un molde de silicona con forma cúbica, que yace sobre una superficie con temperatura menor a 4 °C. Sobre el molde cúbico se coloca el otro molde, que es de resina y alberga el negativo de los cuatro micropocillos donde se realiza el cultivo celular. Este entorno frío permite reticular en menos de 10 minutos la plataforma de cultivo al completo. Se desmolda el cubo (Figura 8) pasado ese tiempo y se conserva en PBS estéril a 4 °C hasta su uso.



**Figura 8.** Soporte de cultivo/hidrogel de agarosa (1,5% p/v) cúbico con 4 pocillos de forma cónica.

### 3.6.2. LINEAS CELULARES

Las MMCs o células RPMI8226 son linfocitos B humanos, aislados en 1966 de la sangre periférica de un paciente de plasmocitoma de 61 años (ATCC, 2022). Por su parte, las hMSCs son células mesenquimales humanas que provienen de la médula ósea. Se trata células producidas a partir de tejidos humanos normales que son criopreservadas y que presentan potencial de diferenciación (PromoCell, 2022).

### 3.6.3. DESCONGELACIÓN Y EXPANSIÓN CELULAR

Preparación de los medios de cultivo:

- **DMEM completo:** empleado en la descongelación de las hMSCs. Se compone por medio DMEM (89%), FBS (10%) y P/S (1%).
- **Promocell completo:** empleado para la expansión y fabricación de los pellets de las hMSCs. Se compone por medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (89%), su suplemento (10%) y P/S (1%).
- **RPMI completo:** empleado en la descongelación y expansión de las MMCs. Compuesto por RPMI 1640 con rojo fenol (88%), FBS (10%), L-glut (1%) y P/S (1%).
- **Medio SRF (sin rojo fenol):** empleado en el cultivo para que el rojo fenol no interfiriera en el ensayo MTS: Compuesto por medio RPMI completo, pero usando RPMI 1640 sin rojo fenol

hMSCs:

El día 0 de cultivo celular se han de descongelar y dejar en expansión las hMSCs. Para ello se recupera un criotubo congelado en nitrógeno líquido que contenga 1 millón de hMSCs en 1 mL de FBS con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se introduce el criotubo el baño a 37 °C durante

1 minuto para descongelar el contenido y, tras ese tiempo, se resuspenden las células en 9 mL de medio DMEM completo para inactivar el DMSO (gracias al FBS) y se centrifugan a 250 G durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de medio Promocell completo. Se cuentan las células en la cámara Neubauer y se siembran a razón de 300000 células/flascón (T75 adherentes) en un volumen final de 10 mL. Las células se dejan en expansión durante 4 días en el incubador, renovando los 10 mL de medio al 2º día de cultivo tras realizarles un lavado con PBS.

Al 4º día del cultivo, se han de preparar los pellets de hMSCs que se sembrarán posteriormente junto con las MMCs. Para ello se emplean criotubos con tapas agujereadas, que permiten la correcta oxigenación de las hMSCs y ofrecen una forma cónica para la correcta formación del pellet. Los pellets están formados por 3 µL de microesferas adherentes Cytodex (previamente acondicionadas en medio Promocell completo) y por 60.000 hMSCs en 300 µL de medio Promocell completo. Para la correcta distribución de las esferas y las células se resuspenden manualmente con ayuda de una pipeta cada 30 minutos un total de 5 veces. Finalmente, tras otra media hora desde la última homogeneización, se añaden 300 µL de medio de expansión extra (obteniendo un volumen final de 600 µL) y se deja reposar 72 horas para finalizar la formación del pellet.

#### MMCs

También en el 4º día de cultivo se descongelan 5 millones de células de mieloma múltiple provenientes de un criotubo con 1 mL de medio con un 5 % de DMSO. Se introduce el criotubo en el baño a 37 °C durante 1 minuto y rápidamente se resuspenden y se transfieren a 9 mL de medio RPMI completo (el FBS de este medio permite inactivar el DMSO). A continuación, se centrifugan las células 5 minutos a 250 G y se resuspende el pellet celular de MMCs en 4 mL de medio RPMI completo. Se cuentan las RPMI 8226 con ayuda de una cámara Neubauer, se siembran a razón de 5 millones de células/flascón T25 no adherente en un volumen final de 20 mL y se dejan en expansión en el incubador durante 3 días.

#### **3.6.4. SIEMBRA Y CULTIVO**

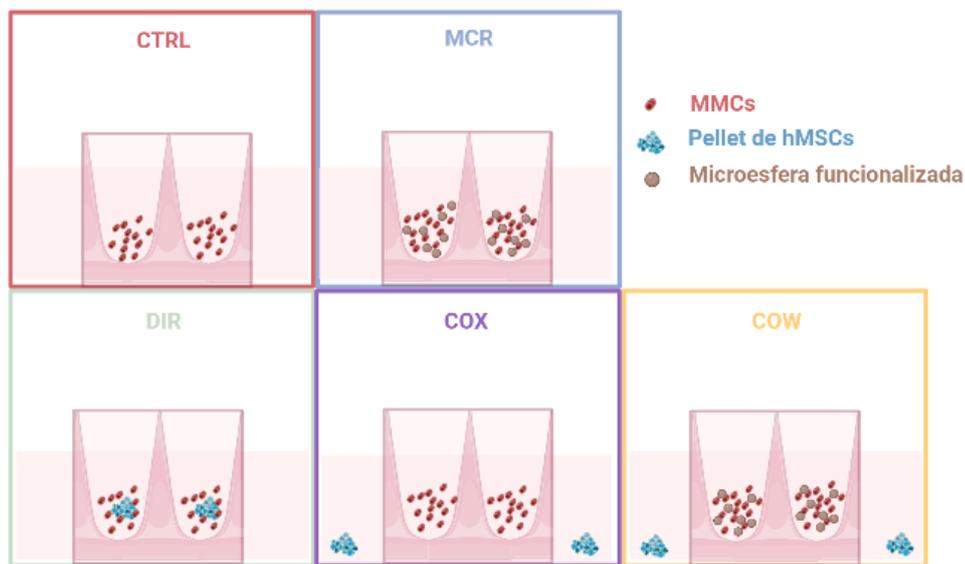
Para la siembra se sitúan los hidrogel en pocillos de placas p12 (se emplea una placa para cada condición del cultivo) tal y como se muestra en la Figura 9 y se retiran los restos de DPBS que puedan quedar con ayuda de una micropipeta. Además, se ha de preparar medio SRF que se empleará durante el resto del cultivo celular.



*Figura 9. Soportes de cultivo/hidrogel en placa p12 para el cultivo celular.*

Se llevan a cabo diferentes condiciones de cultivo de las células RPMI 8226 o MMCs (Figura 10):

- Cultivos sin microgel:
  - Condición control (CTRL): consiste en una suspensión de MMCs en el hidrogel.
  - Condición de co-cultivo directa (DIR): suspensión de MMCs y pellets de hMSCs en un mismo pocillo de agarosa.
  - Condición co-cultivo indirecto (COX): suspensión de MMCs en el hidrogel junto con el pellet de hMSCs fuera del pocillo de agarosa.
- Cultivos con microgel:
  - Condición monocultivo (MCR): suspensión de MMCs junto con el microgel en el mismo pocillo.
  - Condición co-cultivo indirecto (COW): suspensión de MMCs junto con el microgel en el mismo pocillo y el pellet de hMSCs fuera del hidrogel.



**Figura 10.** Ilustración del cultivo celular mostrando las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW. Creado con BioRender.com

Para aquellas condiciones de cultivo con microgel, el primer paso es transferir el volumen de microesferas al micropocillo. Para añadirlo se prepara una suspensión de microesferas de todos los tipos (mix) donde el porcentaje de cada tipo sea del 25%. Para el total de microesferas a añadir se tiene en cuenta el número total de micropocillos y que el porcentaje del micropocillo ocupado por estas corresponde al 7% del volumen total del micropocillo (en este caso 8.4  $\mu$ L). Se han de acondicionar todos los tipos de microesferas durante 30 minutos por separado y luego se mezclan en la solución mix, desde la que se reparten los 8.4  $\mu$ L de microesferas en cada micropocillo.

Para aquellas condiciones en las que hay un co-cultivo, se han de transferir los pellets de hMSCs con ayuda de una pipeta y puntas cortadas. En el caso de los cultivos indirectos, los pellets se transfieren al pocillo de la placa (fuera del hidrogel), añadiendo 1 pellet por cada pocillo del hidrogel que presente MMCs. En el caso del cultivo directo, se transfieren los pellets directamente al micropocillo que contenga las MMCs. (Figura 10).

De manera común, en todas las condiciones independientemente del resto de elementos, se han de añadir las células plasmáticas. Para ello, se recuperan las MMCs del flascón, se centrifugan 5 minutos a 250 G y se cuentan con ayuda de la cámara Neubauer. Una vez conocida la cantidad de células, se preparan las necesarias a una concentración de 60.000 MMCs/100  $\mu$ L de medio y se siembran en cada uno de los micropocillos del hidrogel. Es relevante remarcar que la proporción de hMSCs y de MMCs sembrada ha de ser aproximadamente 1:1 que es la razón por lo que se siembran 60.000 células de mieloma en cada micropocillo y se siembran 4 pellets de 60000 células mesenquimales cada uno por cada hidrogel.

Finalmente, se completa el volumen del pocillo de la placa p12 por fuera del hidrogel con medio RPMI completo (aproximadamente 1,5 mL por pocillo de la placa). Los pocillos de la placa que queden vacíos se llenan con 1 mL de DPS/H<sub>2</sub>O miliQ estéril, para contrarrestar la evaporación del medio.

### **3.6.5. ENSAYOS CELULARES**

#### **3.6.5.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Para preparar las muestras de los ensayos celulares es necesario trasladar el contenido de los micropocillos a Eppendorf con los que poder trabajar. Como las células estarán un tiempo en estos, se agujerean las tapas, asegurando así la correcta difusión de gases de las muestras.

En el caso de las muestras sin microgeles ni co-cultivo directo (CTRL y COX), las células se recogen del micropocillo homogeneizando suavemente el contenido y se transfieren al Eppendorf correspondiente. Se realizan dos lavados del micropocillo con 100  $\mu$ L de DPBS homogeneizando el contenido y transfiriéndolo al Eppendorf, para asegurarse de la correcta recogida de las células. Además, se comprueba en el microscopio óptico que no queden células en los micropocillos, de lo contrario, se realizan tantos lavados con DPBS como sean necesarios.

En el caso de las muestras del co-cultivo directo (DIR) se recogen las muestras del pocillo sin homogenizar y con puntas de micropipeta cortadas, con el fin de recoger adecuadamente los pellets de hMSCs. El contenido se transfiere al Eppendorf correspondiente haciéndolo pasar por un filtro de 70 mm para retener el pellet sin retener las MMCs. En este caso, se realizan 3 lavados con DPBS del micropocillo y se comprueba en el microscopio que no queden MMCs.

En el caso de las muestras con microgel (MCR y COW), se recoge el contenido del micropocillo homogeneizando el contenido, también con puntas de micropipeta cortadas (para facilitar la recogida de las MO funcionalizadas). El contenido se transfiere a un Eppendorf intermedio (también esterilizado) situado junto al imán. Se homogeniza el contenido en este Eppendorf, permitiendo que las MMCs se despeguen de las MO, tras lo cual se permite que el imán retenga las MO y se transfieren las MMCs al Eppendorf con tapa agujereada, se realizan 3 lavados de DPBS repitiendo el proceso para retener las MO y recuperar las células.

#### **3.6.5.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS (MTS)**

Para determinación de la viabilidad celular se realizan ensayos de MTS los días 3, 5 y 7 desde la siembra en los pocillos de agarosa. El MTS se trata de un ensayo colorimétrico por lo que la

cantidad de células viables es proporcional a la absorbancia del reactivo coloreado resultante. La reacción se basa en la reducción del reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium) a formazan (compuesto coloreado) gracias a la actividad de la enzima deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H. Es por esto por lo que el ensayo solo detecta aquellas células que son viables, ya que las células no viables no presentan actividad enzimática (Ltd, 2010).

Una vez se tienen las células en los Eppendorf se centrifugan durante 5 minutos a 250 G y se resuspenden en 250 µL/Eppendorf de medio SRF. Paralelamente, se ha de preparar una curva de calibrado empleando MMCs. Para ello, se recogen las células necesarias del flascón T25 donde las sobrantes de la siembra continúan en expansión y se realizan 3 réplicas biológicas de células por cada punto que se quiera incluir en la curva.

Cuando se tienen las células de las muestras y de la curva en 250 µL de medio SRF se añaden 25 µL de reactivo de MTS y se incuban en oscuridad durante 1 h. Transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se centrifugan y se coloca el sobrenadante en una placa p96 para su lectura a 490 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector realizando 2 réplicas técnicas por cada réplica biológica (RB).

Los datos de absorbancia obtenidos se trabajan en Excel, donde se correlacionan con el número de células. Finalmente, se analizan las diferencias significativas entre poblaciones empleando GraphPad (Dotmatics, 2023).

### **3.6.5.3. PROLIFERACIÓN CELULAR (CICLO CELULAR)**

Para determinar las fases del ciclo celular en las que se encuentran las MMCs de las diferentes condiciones de cultivo se emplea un ensayo de citometría de flujo. Para ello se transfieren las muestras de los Eppendorf a los tubos de citometría, donde siguen las instrucciones del fabricante (ABCAM company, 2022) para trabajar las muestras y pasarlas por el citómetro a velocidad baja. Cabe destacar que en el caso del co-cultivo directo (DIR), al no estar seguros de tener exclusivamente MMCs, se realiza un marcaje sencillo con el marcador superficial de hMSCs CD90 y el marcador superficial de MMCs CD138. Estos incluyen fluorocromos que no solapan con los fluorocromos que poseen los reactivos del ensayo, ni interfieren con el desarrollo del mismo.

Los resultados obtenidos se analizan en el software específico de citometría de flujo Flowing Software 2 (Turku Bioscience, 2018) tal y como se muestra en el anexo 7.4.1 y con los porcentajes de fases en cada condición, se realizan análisis estadísticos empleando GraphPad.

### **3.6.5.4. VIABILIDAD CELULAR (APOPTOSIS)**

Para determinación de la viabilidad celular de las MMCs en cultivo se realiza un ensayo de apoptosis en el citómetro de flujo basado en la anexina y el propidio. Para ello se transfieren las muestras de los Eppendorf a los tubos de citometría, donde siguen las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec Company, 2021) para trabajar las muestras y pasarlas por el citómetro a velocidad alta. Cabe destacar que en el caso del co-cultivo directo (DIR), al no estar seguros de

tener exclusivamente MMCs, se realiza un marcaje sencillo con el marcador superficial de hMSCs CD73 y el marcador superficial de MMCs CD138. Estos incluyen fluorocromos que no solapan con los fluorocromos que poseen los reactivos del ensayo, ni interfieren con el desarrollo del mismo.

Los resultados obtenidos se analizan en el software específico de citometría de flujo Flowing Software 2, tal y como se muestra en el anexo 7.4.2 y con los porcentajes de fases en cada condición, se realizan análisis estadísticos empleando GraphPad.

### 3.6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el campo biológico es muchas veces complicado obtener múltiples RBs de un mismo experimento. Teniendo en cuenta que el mínimo de réplicas para realizar cualquier análisis estadístico es 3, se ha procurado tener 3 o más RBs en todos los experimentos de cuantificación. Además, también se ha procurado tener un mínimo de 2 réplicas técnicas por cada réplica biológica para poder subsanar cualquier fallo del equipo de análisis.

Una vez se tienen los datos de cualquiera de los ensayos realizados, se ejecuta un primer análisis en Graphpad para poder detectar y eliminar outliers, descartando así cualquier dato anómalo con el método ROUT con una Q=5%.

Tanto para la representación de los tamaños de las MO como para el análisis de los datos de caracterización, se emplea la herramienta Excel y los resultados obtenidos se muestran como la media  $\pm$  la desviación típica.

Para el estudio de los datos relativos a los cultivos celulares, se emplea la herramienta GraphPad. Tras eliminar los valores anómalos, se realiza un análisis de normalidad de los datos del tipo Shapiro-Wilk. En caso de que los datos sean normales, se realizan los ensayos paramétricos one-way ANOVA (para comparar diferencias respecto a una variable) o two-ways ANOVA (para comparación de múltiples variables). Si las desviaciones estándar (SD) son iguales, el ANOVA se emplea sin corregir y, si no se puede decir que las SD sean equivalentes, se debe realizar la corrección Brown-Forsythe. En el caso de que las muestras no superen el test de normalidad, se emplea un test no paramétrico del tipo "Kruskal-Wallis". Para las muestras normales, las diferencias entre grupos se consideran significativas estadísticamente si el p-valor es igual o inferior a 0,05. Las diferencias se expresan como "ns" o en blanco ( $p \geq 0,05$ ) en muestras que no son estadísticamente significativas y como \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ) si sí existen dichas diferencias. En el caso de que las muestras no superen el test de normalidad, la diferencias significativas se expresan, en cualquier caso, como #.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado global del trabajo es el desarrollo de un modelo de enfermedad de mieloma múltiple mediante el desarrollo de una plataforma de cultivo *in vitro* y en estático que permita recrear el nicho biológico (tanto su componente celular como su componente acelular) en el que se desarrolla esta neoplasia. Para ello, se fabrican microesferas magnéticas de alginato

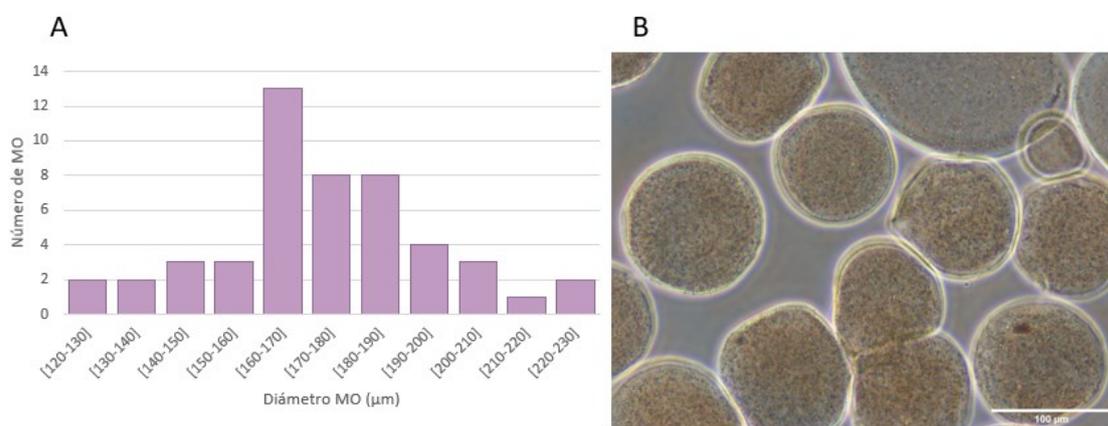
funcionalizadas, que simulan el componente acelular y se emplean las hMSCs como componente celular.

Las microesferas se estudian y caracterizan tanto morfológicamente como bioquímicamente gracias a diversas técnicas y ensayos y la plataforma se testea mediante la realización de diversos cultivos celulares y sus respectivos ensayos de proliferación y viabilidad celular.

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS

Como se ha mencionado en el apartado 3.2.2., se han fabricado MO empleando un sistema de microfluídica (Figura 5) fabricado en silicona y basado en una dispersión de un medio acuoso en uno lipídico. Debido a los fundamentos de la microfluídica, los parámetros del caudal de los MC y MD son los que modulan el diámetro de las partículas fabricadas, por lo que son los artífices de las microesferas empleadas en este trabajo. Utilizando una de las síntesis fabricadas como muestra del proceso y midiendo el diámetro de 50 de ellas, se obtiene un tamaño medio de  $174 \pm 22 \mu\text{m}$ .

Su síntesis por microfluídica permite obtener una distribución de tamaños normal, como se observa en la (Figura 11A). Además, se observa que el grueso de las microesferas obtenidas presenta un diámetro de entre 170 y 200  $\mu\text{m}$ . También cabe destacar la homogénea distribución de las nanopartículas de ferrita de hierro, evidenciada por el color pardo que toman las microesferas y por la falta de agregados de ferrita de hierro en el interior (Figura 11B). Esto permite afirmar que el método de dispersión de las nanopartículas seleccionado es efectivo.



**Figura 11.** A) Distribución del diámetro de las MO de alginato con ferrita sin funcionalizar. B) MO observadas en el microscopio invertido en una escala de 100  $\mu\text{m}$ .

El tamaño obtenido es aceptable para el posterior uso de estas microesferas como entorno biomimético en el mieloma múltiple, puesto que se han probado con anterioridad microesferas de este tamaño con éxito en cultivo (García-Briega et al., 2022).

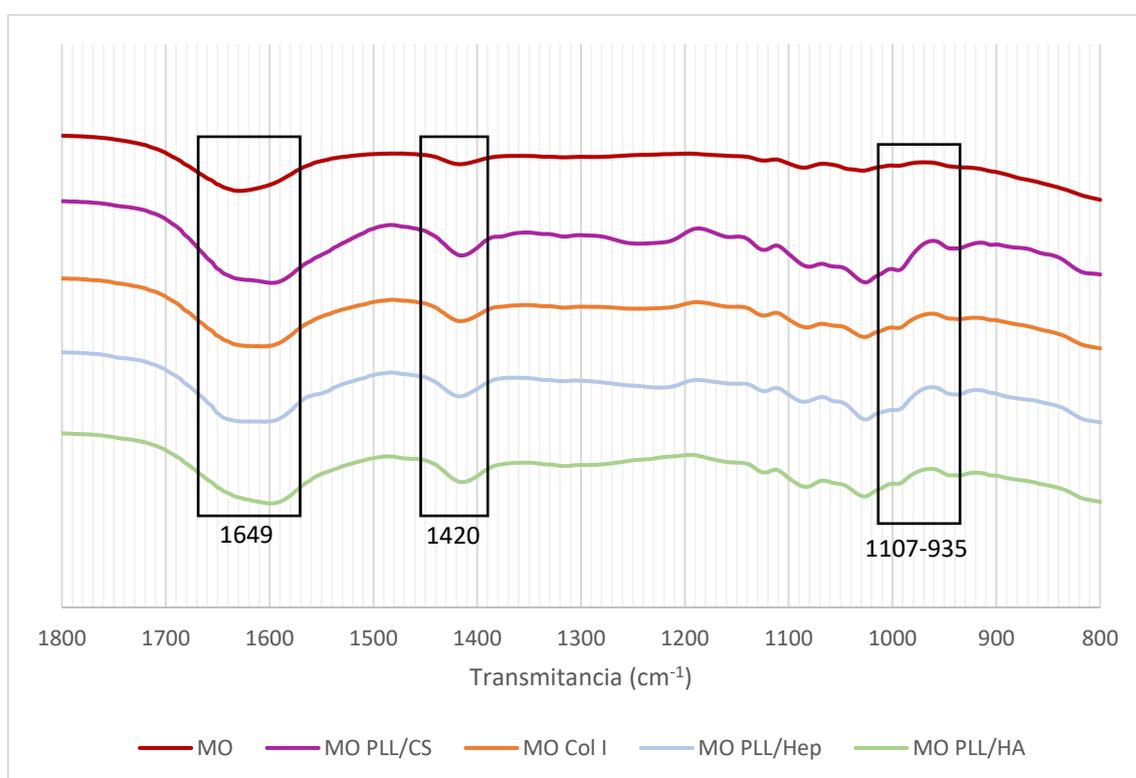
## 4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS

La microesferas funcionalizadas mediante los diferentes tipos de recubrimiento LbL (PLL/CS, PLL/Hep, Col I y PLL/HA) expuestas en el apartado 3.3 se caracterizan mediante diversas técnicas que permiten tanto comprobar la presencia de recubrimiento (FTIR) como cuantificar los polielectrolitos que se emplean para dicho recubrimiento (ensayo Blyscan, ninhidrina e hidroxiprolina).

### 4.2.1. FTIR

Esta técnica permite intuir la presencia de los diferentes materiales a través de las vibraciones de sus diferentes grupos funcionales. Puesto que el alginato es un elemento común a todas las microesferas, todas ellas presentan sus picos característicos. No obstante, se observan ligeros desplazamientos que se deben a la presencia de los elementos de las diferentes funcionalizaciones y, por ende, confirman el éxito de la técnica.

Cómo se muestra en las Figuras 24-28 del anexo 7.3, se detecta un pico entre  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de las MO. Este pico se atribuye a las vibraciones de estiramiento de los grupos OH presentes en el alginato, probablemente debido a la presencia de agua en la muestra en el momento del análisis (Larosa et al., 2018). Por otro lado, en la Figura 12 se muestra tan solo una sección del espectro, puesto que es la zona donde se ha encontrado la información más relevante. De hecho, se remarcan 3 intervalos del espectro donde hay diferencias (Figura 12).



**Figura 12.** Espectros de FTIR de las MO, MO PLL/CS, MO Col I, MO PLL/Hep y MO PLL/HA y sus picos característicos.

En primer lugar, atendiendo a la Figura 28 del anexo 7.3, se observan diversos picos característicos del Col I en la región amida I ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) y II ( $1552\text{ cm}^{-1}$ ). Estos picos se corresponden al estiramiento del grupo CO o bien a la unión de un hidrógeno al grupo COO- del Col I y a la señal del grupo NH acoplada al estiramiento del grupo CN, respectivamente (Ge et al., 2020). Ambos picos se pueden observar en el espectro de las MO Col I, aunque aparecen ligeramente desplazados, probablemente debido a la influencia de picos del Alg, la PLL y el CS previamente mencionados que se encuentran cercanos a esas regiones.

Se detecta también un pico alrededor de  $1649\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del alginato en polvo empleado para el recubrimiento de las microesferas (Figura 24 del anexo 7.3) que se corresponde a un grupo carboxilo del este compuesto. Este mismo pico se detecta también en el resto de los espectros de las MO (Figura 12), sin embargo, se observa que sufre un desplazamiento con respecto al espectro del alginato en polvo (Figura 24 del anexo 7.3). Este desplazamiento podría ser el resultado de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en las microesferas (Larosa et al., 2018), ya que se emplea  $\text{CaCO}_3$  para el entrecruzamiento del alginato.

Por otro lado, se puede observar la presencia de dos picos característicos de la PLL (Figura 25 del anexo 7.3) en las longitudes de onda  $1640$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$  que se corresponden a la vibración de las amidas tipos I y II, respectivamente (Müller, 2020). En las microesferas recubiertas (todas ellas presentan PLL tal y como se muestra en la Figura 12 y las Figuras 25, 26, 27 y 28 del anexo 7.3) el desplazamiento del pico característico del alginato presente en  $1649\text{ cm}^{-1}$  podría resultar, además de por la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , por el efecto de estos picos de la PLL.

Asimismo, parece que estos dos picos característicos de la PLL ( $1640$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) aparecen en combinación con picos característicos de otros compuestos en los espectros de todos los tipos de microesferas recubiertas (Figura 12). Un ejemplo es el caso del espectro de la heparina (Figura 26 del anexo 7.3), donde se observa un pico característico en  $1645\text{ cm}^{-1}$  que se corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos CO del ácido urónico (Miao et al., 2022). Este pico parece verse desplazado en el espectro de las MO PLL/Hep debido al efecto sumado de los picos de la PLL previamente mencionados.

Se puede apreciar un pico en  $1614\text{ cm}^{-1}$  en la Figura 27 del anexo 7.3 que se corresponde a la vibración de estiramiento de un grupo COC del HA (Unal et al., 2020), aunque en el espectro de las MO PLL/HA puede aparecer desplazado por el efecto de los picos de PLL y Alg presentes en regiones colindantes.

En la Figura 12 y la Figura 24 del anexo 7.3 se puede observar un pico en  $1420\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a la vibración de estiramientos simétricos de los grupos COO- del alginato (Zhou et al., 2022). Asimismo, cerca de esta región se pueden observar diversos picos característicos de la Hep en la Figura 26 del anexo 7.3. El pico observado en  $1417\text{ cm}^{-1}$  se debe a la vibración del grupo carboxilo (COO-) y el pico en  $1240\text{ cm}^{-1}$  es causado por la presencia de grupos SO (Miao et al., 2022).

Atendiendo a las MO Col I, en la Figura 28 del anexo 7.3, se observa un pico en  $1241\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la señal del grupo NH acoplada al estiramiento del grupo CN del Col I (Ge et al., 2020). En esta misma región, atendiendo a la Figura 25 del anexo 7.3, se observan los picos característicos del CS  $1248/1222$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$  que se corresponden a las vibraciones de los grupos  $\text{SO}_2$  y CO respectivamente del CS (Müller, 2020). El pico en  $1050\text{ cm}^{-1}$  del CS se encuentra

ligeramente desplazado en las MO (Figura 12) por el efecto añadido del pico característico del alginato que se encuentra entre 1107 y 935  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 24 del anexo 7.3) y que es resultado de la vibración de estiramiento del grupo CO del anillo y del efecto de deformación que presentan los grupos CCH y CHO sobre el grupo CO (Larosa et al., 2018). A pesar del desplazamiento comentado, ambos picos característicos del CS se pueden observar tanto en las MO PLL/CS como en las MO Col I (Figura 12), demostrando así la presencia de CS en las MO recubiertas (Müller, 2020). En las MO Col I se observa un pico resultado de la suma de los picos característicos del Col I (1241  $\text{cm}^{-1}$ ) y del CS (1248/1222  $\text{cm}^{-1}$ ).

En la Figura 26 del anexo 7.3, se observa un pico característico de la Hep en la región 1057  $\text{cm}^{-1}$ . Este pico se corresponde a las vibraciones de los grupos COC (Miao et al., 2022) y se puede ver ligeramente influenciado en el espectro de las MO PLL/Hep por la presencia del pico característico del Alg en 1050  $\text{cm}^{-1}$ . Al igual que le sucede al pico característico del HA en 1044  $\text{cm}^{-1}$  que se observa en la Figura 27 del anexo 7.3, el cual se corresponde con la vibración asimétrica de estiramiento del grupo carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) del carboxilato (Unal et al., 2020).

Finalmente, se observa un pico a la longitud de onda de 800  $\text{cm}^{-1}$  en la Figura 26 del anexo 7.3, también correspondiente a la Hep que se debe a las vibraciones de estiramiento COS del grupo sulfato de la aminohexosa (Miao et al., 2022).

#### **4.2.2. BLYSCAN**

Tras el análisis de este ensayo, se obtiene que en 1  $\mu\text{L}$  de MO PLL/Hep hay depositados  $203 \pm 53$  ng de heparina. Por otro lado, 1  $\mu\text{L}$  de MO PLL/CS retienen  $264 \pm 404$  ng de condroitín sulfato. A la vista de los resultados, se puede afirmar que el procedimiento de LbL es eficiente y que sirve para retener los polianiones (CS y Hep) en la superficie de las MO. Esta retención se debe tanto a las interacciones electrostáticas que se dan entre los elementos durante el proceso de LbL como por la estabilización mediante enlaces covalentes del recubrimiento.

#### **4.2.3. HIDROXIPROLINA**

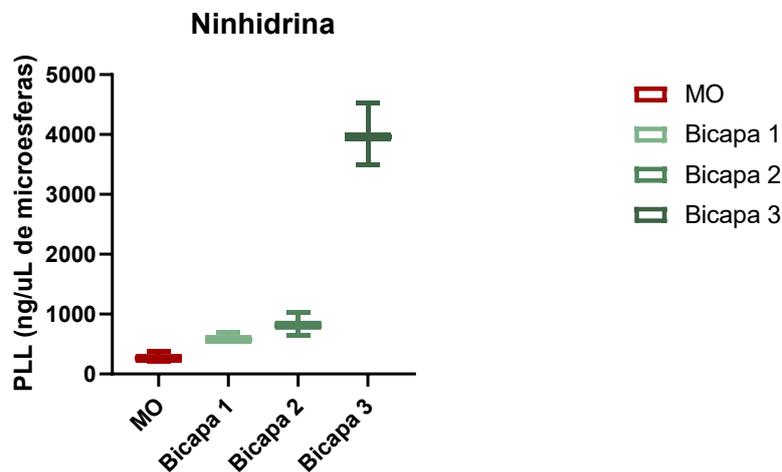
Los resultados de este análisis permiten detectar de forma exclusiva el colágeno I injertado sobre la microesfera. Esto es así porque el colágeno I es el único de los materiales que conforman las MO Col que contiene la hidroxiprolina en su estructura.

Se observa que el control magnético (MO) proporciona una señal diferente a 0. Esto no debería suceder, porque no hay hidroxiprolina en la estructura química del alginato. No obstante, se atribuye a que la microesfera retiene los reactivos e interacciona de forma que da una señal errónea. Por eso, se opta por corregir la señal restando a la señal obtenida en las MO Col la señal de las MO. Con esta corrección se detectan, en 1  $\mu\text{L}$  de MO Col I,  $268 \pm 30$  ng de colágeno I. Este resultado confirma que el recubrimiento de la microesfera por LbL con PLL/CS hace posible el injerto de Col I sobre la PLL mediante GA.

#### 4.2.4. NINHIDIRNA

Para caracterizar el último de los recubrimientos, se recurre a una detección semi-cuantitativa. Debido al parecido químico entre el HA y del Alg, no es posible cuantificar el primero de forma específica y con buena resolución. Por ello se recurre a la detección progresiva de la PLL a través de cuantificar sus aminos. Para ver la deposición de las distintas capas del LbL y confirmar que sucede, se analizan muestras con 1, 2 y 3 bicapas de LbL PLL/HA. De esta manera, se demostraría que el LbL funciona y que se deposita una cantidad aproximada de HA.

Tras la medición de absorbancia de las muestras de las diferentes bicapas y de la curva patrón, se obtiene que la cantidad de PLL en la bicapa 1 es  $330 \pm 72$  ng por cada  $1 \mu\text{L}$  de MO. Tras la adición de la segunda bicapa, la cantidad de PLL total en las MO es  $544 \pm 172$  ng por cada  $1 \mu\text{L}$  de MO. Y, tras la adición de la tercera bicapa, la cantidad de PLL total es  $3713 \pm 493$  ng por cada  $1 \mu\text{L}$  de MO, como se observa en la Figura 13. Así pues, se demuestra la eficacia de la técnica LbL, pudiendo inferir la presencia de HA en las MO funcionalizadas gracias a la constatación de la presencia de PLL en las mismas.



**Figura 13.** Representación de la cantidad de PLL (ng/  $\mu\text{L}$  de microesferas). Se muestran las MO (1) y las MO recubiertas con 1 bicapa (2), 2 bicapas (3) y 3 bicapas (4).

#### 4.3. CULTIVOS CELULARES

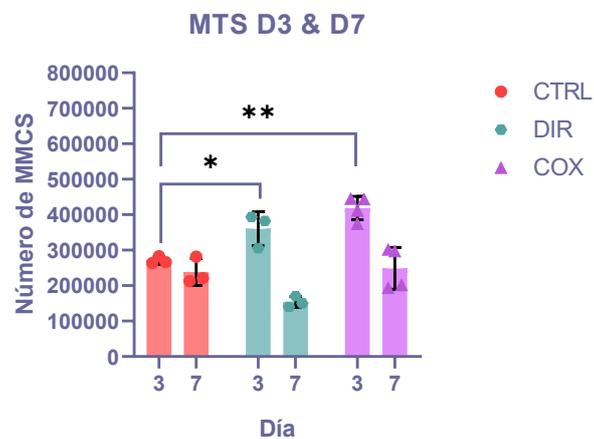
Los cultivos celulares del presente trabajo se realizan empleando distintas condiciones para probar las hipótesis planteadas con relación al co-cultivo y al cultivo con el microgel. La novedad introducida en este trabajo es el hecho de que el cultivo se desarrolla en estático, pero en un entorno 3D que favorece la proliferación.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se concluye que la mejor condición de co-cultivo es el cultivo indirecto ya que es, además el más fácil de manejar. Se ha visto también que las condiciones que más efectos positivos presentan en cuanto a proliferación y viabilidad celular de las MMCs son las condiciones COW y MCR, probablemente debido al efecto positivo de los elementos en la MEC y los factores solubles intercambiados entre las MMCs y las hMSCs.

### 4.3.1. CO-CULTIVO SIN MICROGEL

El co-cultivo celular inicial se realiza considerando tres condiciones distintas, todas ellas sin microgel para observar el efecto individual del co-cultivo. Por un lado, se introduce el pellet de hMSCs en el interior del micropocillo (condición DIR) y por el otro se introduce el pellet de hMSCs fuera del constructo de agarosa (condición COX). Con ello se pretende evaluar cuál de las dos condiciones de co-cultivo, directa o indirecta respectivamente, representa la opción óptima para su posterior desarrollo, tanto a nivel de ejecución como a nivel de respuesta celular (viabilidad y proliferación).

Por un lado, en el ensayo MTS (Figura 14) se comprueba el número de MMCs de cada una de las condiciones en los días 3 y 7 (D3 y D7, respectivamente) del cultivo celular. Atendiendo a los resultados del MTS D3, se puede observar claramente que el número de MMCs es mayor en la condición COX, seguido por la condición DIR y con la condición CTRL presentando el menor número de células. Este resultado concuerda con lo esperado puesto que se ha visto que la interacción indirecta que se da entre las hMSCs y las MMCs mediante factores solubles favorece la proliferación celular (Klamer & Voermans, 2014). En cuanto a la condición DIR, aunque la interacción mediada por factores solubles favorece la proliferación (como sucede en COX), se ha visto que la interacción directa entre ambos tipos celulares provoca el arresto de las MMCs en fases no proliferativas del ciclo celular (Nefedova et al., 2003), como G0 o G1. Este efecto de la interacción directa podría estar contrarrestando el efecto de la interacción indirecta, provocando una menor proliferación celular como se observa en la gráfica. Cabe destacar que, aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones COX y DIR en el MTS D3, sí que se puede hablar de la existencia de diferencias significativas entre el monocultivo (CTRL) y el co-cultivo (COX y DIR).

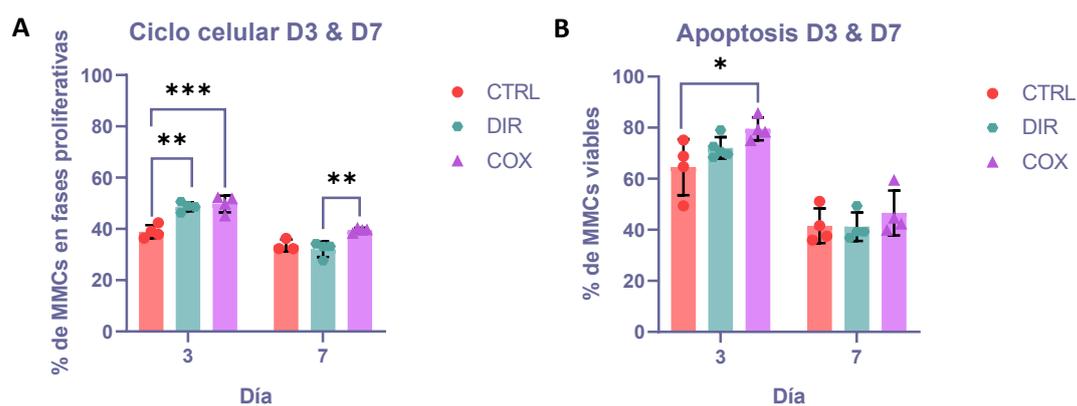


**Figura 14.** Ensayo MTS de proliferación de MMCs a 3 y 7 días en las condiciones CTRL, DIR y COX.

No obstante, al avanzar el cultivo en el tiempo, se puede constatar que la tendencia observada en el ensayo a día 3 no se mantiene, sino que el número de células disminuye con respecto a lo visto anteriormente en todas las condiciones. Esto podría deberse a un error experimental que puede haber provocado un déficit de oxígeno prolongado, provocando un aumento de la muerte celular.

En relación a las pruebas de citometría de flujo, se quiere destacar que se aprovecha para comprobar si la forma de recoger las muestras deja o no hMSCs en el supuesto sobrenadante exclusivo de MMCs en el caso DIR. Para ello, como se ha comentado en materiales y métodos, se añaden marcadores de superficie específicos de ambos y se analiza su presencia en la muestra (tanto de ciclo como de apoptosis) tal y como se indica en el apartado 7.4.3 de anexos. Como el porcentaje de hMSCs no es superior al 5% del total de la muestra en ambos casos y en todos los tiempos, se puede asumir que el resultado del ensayo es representativo de lo que sucede en cuanto a viabilidad y proliferación con las MMCs y los resultados de MTS son correctos, así como las conclusiones extraídas en las muestras de citometría de flujo.

De hecho, en la prueba de ciclo celular, se observa el porcentaje de MMCs en cada una de las fases del ciclo celular. Es posible cuantificar el porcentaje de la muestra que está en fases proliferativas (fases G2, M y S) y, por otra, cuantificar cuántas células están en fases no proliferativas (G0 y G1) (Israels & Israels, 2000). En este trabajo se opta por representar únicamente el porcentaje de muestra en la fase proliferativa, como se observa en la Figura 15A. Respecto al ensayo de apoptosis, se representa exclusivamente el porcentaje de células viables (anexina y propidio negativas) ya que debe haber algún problema con el protocolo empleado y la diferenciación de las apoptóticas de las muertas ha sido una tarea compleja (Figura 15B).



**Figura 15.** A) Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, DIR y COX. B) Ensayo de apoptosis (viabilidad celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, DIR y COX.

El análisis del ciclo celular (Figura 15A) concuerda con los valores de MTS observados a 3 días (Figura 14). Un mayor estado proliferativo celular se traduciría en un mayor número de células detectadas en el MTS (Figura 14). De hecho, la distribución de valores en las condiciones (COX>DIR>CTRL) también coincide con los porcentajes de células viables como se observa en la figura (Figura 15B). Esto implica que, a 3 días, la plataforma mantiene a las células y el co-cultivo tiene un efecto en el desarrollo de las MMCs.

Sin embargo, la viabilidad cae drásticamente a día 7. Estos valores concuerdan con lo visto en el MTS, por lo que igual el fallo en el trabajo experimental del que se hablaba previamente no afecta tanto a los resultados como se pensaba. Esto lleva a considerar que los malos resultados de viabilidad y proliferación a día 7 podrían deberse a una saturación de la plataforma de cultivo o bien por falta espacio o bien por una falta de nutrientes. Otra posible hipótesis que se plantea es que, al haber el doble de células como mínimo en los pocillos de co-cultivo, la caída de casi la

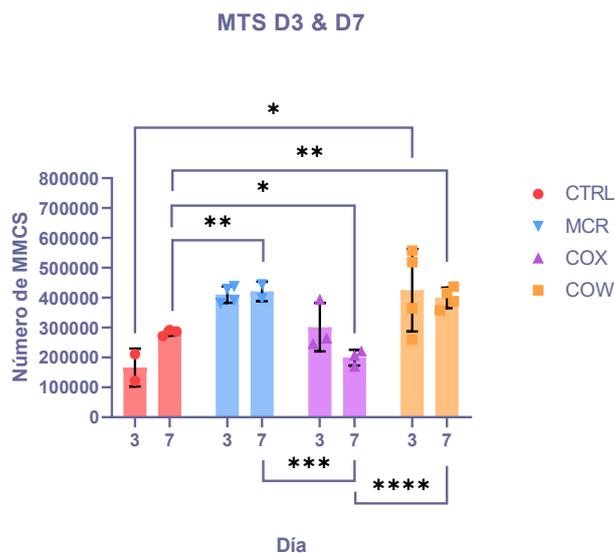
mitad de la población en ambas se dé por el hecho de haber consumido demasiado rápido los recursos (pese a que CTRL también cae, pero no de una forma tan abrupta). A pesar de los resultados negativos tras una semana, se pueden observar diferencias significativas en las fases proliferativas entre el monocultivo y el co-cultivo indirecto (Figura 15A). En viabilidad las diferencias parecen menos claras, aunque concuerda el mejor valor de COX con el mayor porcentaje de células proliferativas.

A la vista de los resultados y de la ejecución, se opta por continuar con el método de co-cultivo indirecto (COX), que presenta los mejores datos de viabilidad. Se cree que el motivo por el que el co-cultivo directo (DIR) presenta una menor viabilidad que la condición indirecta es que el contacto directo entre células lleva a un arresto del ciclo celular en fases no proliferativas (Nefedova et al., 2003).

Por otro lado, cabe destacar la caída drástica de la viabilidad y proliferación a D7 mencionada previamente. Las hipótesis expuestas sobre el motivo de esta disminución se probarán añadiendo un punto más en la curva de MTS (a día 5). Este punto permitiría ver si hay un pico en la proliferación que cae por falta de nutrientes o si se da un estancamiento debido a la saturación de la plataforma. Además, se añadirá un cambio de medio cada dos días en lugar de cada 3, aunque eso disminuya probablemente el factor del co-cultivo indirecto por la pérdida más rápida de los factores solubles (que se eliminan con el medio) ya que se considera que es más relevante aportarles a todas las células los nutrientes.

#### **4.3.2. CO-CULTIVO CON MICROGEL**

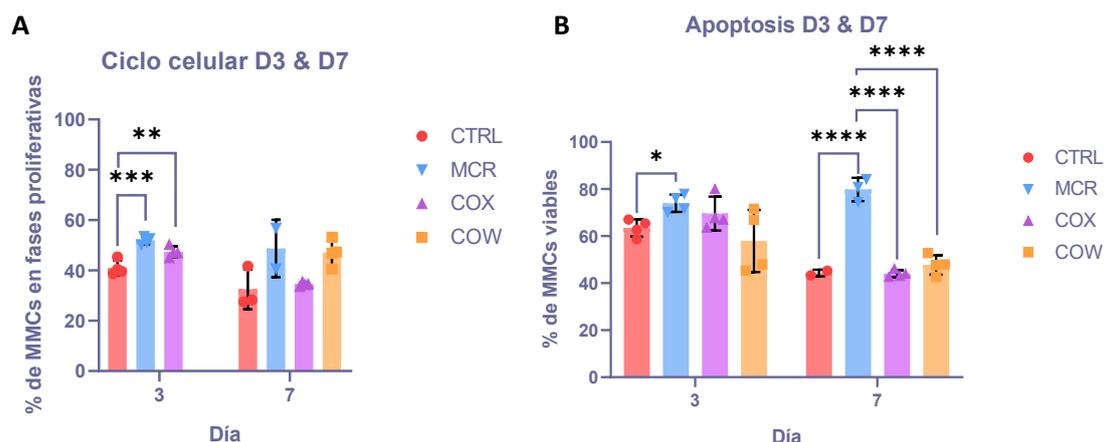
El presente co-cultivo se realiza de manera indirecta introduciendo la variable de los microgeles con los distintos tipos de funcionalizaciones para constatar el efecto de los mismos sobre la proliferación y viabilidad de las MMCs. Para ello se emplea la condición de control (CTRL); una condición sin co-cultivo, donde solo se estudia el efecto de las MO funcionalizadas (MCR) y dos condiciones de co-cultivo, una sin microgel (COX, ya incluida en el cultivo anterior) y una con el microgel (COW). Lo que se observa con este cultivo concuerda con lo visto sin el microgel, y confirma la hipótesis de que los diferentes elementos de la MEC contribuyen a una mayor proliferación celular. En este co-cultivo, se mantiene la frecuencia de cambio de medio del co-cultivo anterior pese a la hipótesis desarrollada en vista de los resultados del mismo ya que se quiere comprobar si los efectos observados son realmente debidos una falta de nutrientes o saturación de la plataforma y no a errores humanos durante el experimento.



**Figura 16.** MTS de proliferación de MMCs a 3 y 7 días en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW.

Respecto a los resultados de proliferación celular (Figura 16), lo primero que se destaca es que la condición COX presenta la misma tendencia que en el cultivo anterior: un aumento incrementado (con respecto a CTRL) del número de MMCs a 3 días y una caída a 7 días. Esta disminución de la proliferación hace que se descarte que los resultados del co-cultivo anterior sean debidos al error humano en la manipulación de muestras. Atendiendo a las condiciones MCR y COW del ensayo MTS (Figura 16) también se puede observar que los microgeles presentan un impacto positivo sobre el número de MMCs tanto a D3, pero que la proliferación se para y el número de MMCs se mantiene a D7. La similitud entre el co-cultivo y la ausencia de este parece indicar que el microgel posee un efecto mucho mayor al esperado, enmascarando el efecto del co-cultivo. Por último, hay que subrayar que en este cultivo la condición CTRL aumenta ligeramente la proliferación entre 3 y 7 días, lo que es diferente a lo sucedido previamente.

Teniendo en cuenta todo lo comentado, toman fuerza las hipótesis de la falta de nutrientes (muerte en COX) o la saturación de la plataforma (MCR y COW) a 7 días de cultivo. Es por esta razón por la que las muestras añadidas en este segundo co-cultivo diferentes al anterior (COW y MCR) se repetirán junto con las de CTRL, DIR y COX en un nuevo cultivo y se ensayará el MTS a 3,5 y 7 días. Además, se cambiará el medio cada 2 días porque, de nuevo, se prefiere perder ligeramente el efecto del co-cultivo a no poder comprender al completo el funcionamiento de la plataforma.



**Figura 17.** A) Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW. B) Ensayo de apoptosis (viabilidad celular) de MMCs realizado a días 3 y 7 en las condiciones CTRL, MCR, COX y COW.

Respecto a los resultados de ciclo celular, se puede ver en la FIG 17A que se perdieron las muestras de la condición COW a día 3. La causa de esto es que parecen haber sido añadidas, por error, a las muestras de apoptosis de la misma condición. Es por este motivo que el ensayo a D3 será repetido en un cultivo posterior, confirmando los resultados previos y añadiendo el dato sobre el co-cultivo con microgel (COW). Teniendo esto en cuenta, se puede observar en la Figura 17A que el porcentaje de células que se encuentran en fases proliferativas del ciclo celular disminuye con el tiempo (desde el D3 hasta el D7) para casi todas las condiciones, lo cual podría deberse a los motivos ya mencionados. La única condición que mantiene un número de MMCs estable pero que no aumenta, es MCR, lo cual podría reforzar la idea de que la adición de las MO funcionalizadas presenta efectos positivos sobre las células tumorales y es esencial si el objetivo en un futuro es mantener o incrementar biopsias de pacientes en esta plataforma. Destacar también que, debido a la variedad de resultados obtenidos en el ensayo de ciclo celular a D7 (Figura 17A), no es posible obtener ninguna conclusión clara en relación a como cada condición afecta a las fases del ciclo celular de las MMCs a tiempos más largos.

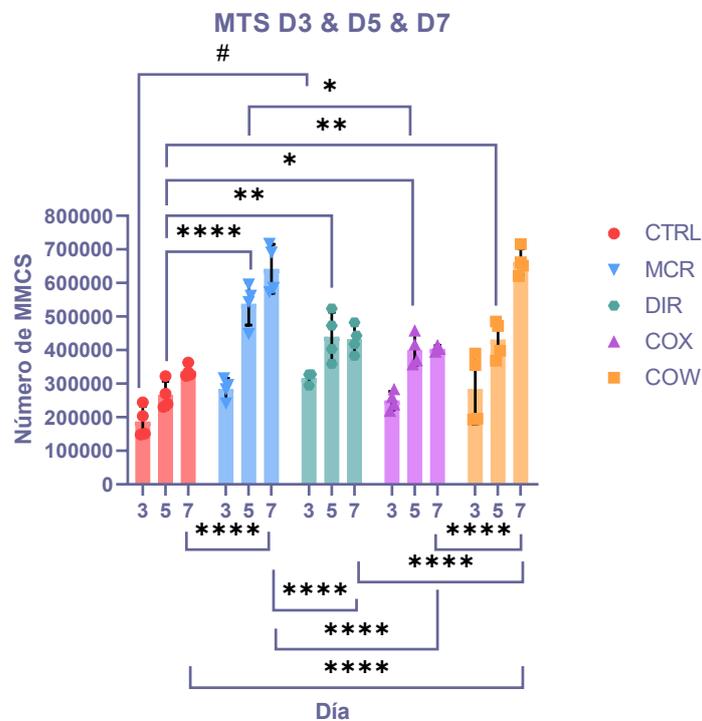
Finalmente, en cuanto al ensayo de apoptosis (Figura 17B), las células con una menor viabilidad a D3 son las de la condición COW, lo cual no concuerda con el resto de resultados obtenidos hasta el momento. Además, a D7 la condición MCR es la única que mantiene un porcentaje de viabilidad estable con respecto al D3; sin embargo, se esperaría que la viabilidad se mantuviera también en la condición COW, como se observa que sucede en los resultados del ensayo MTS a D7 (Figura 16). Esto podría deberse, de nuevo, a los motivos previamente expuestos (saturación de la plataforma o falta de nutrientes). Por ello, dichos motivos se comprobarán en el siguiente co-cultivo.

#### 4.3.3. CO-CULTIVO CON Y SIN MICROGEL

Como se ha comentado en los dos cultivos previos, se decide realizar un nuevo cultivo incluyendo todas las condiciones planteadas (CTRL, MCR, DIR, COX y COW). En ese cultivo se repite de nuevo el ensayo MTS a D3 y D7 y, además, se añade un ensayo MTS a D5 para comprobar si los resultados de baja viabilidad y proliferación a D7 obtenidos previamente se deben a la saturación

de la plataforma. Además, se aumenta la frecuencia del cambio de medio reduciéndolo de cada 3 días (como se había realizado en los cultivos anteriores) a cada 2 días, para comprobar si la falta de nutrientes pudiera ser la causa de la reducción de la viabilidad y proliferación. Por otro lado, se opta por repetir el ensayo de ciclo celular a D3 para subsanar la pérdida de las muestras de la condición COW.

Atendiendo al ensayo celular MTS (Figura 18) se puede observar que, en casi todas las condiciones, el número de células aumenta a medida que transcurren los días. La excepción son las condiciones DIR y COX que parece que quedan estancadas tras el D5, manteniendo el mismo número de MMCs hasta el D7. Aún con todo, la tendencia parece haber cambiado con respecto a los cultivos anteriores ya que, en ningún caso, el número de células es menor a D7 que a D3. Esto podría estar indicando que aquello que impedía la progresión del cultivo no era la saturación de la plataforma sino la falta de nutrientes para tal cantidad de células y, por lo tanto, la solución sería realizar el cambio de medio cada dos días en lugar de cada tres.

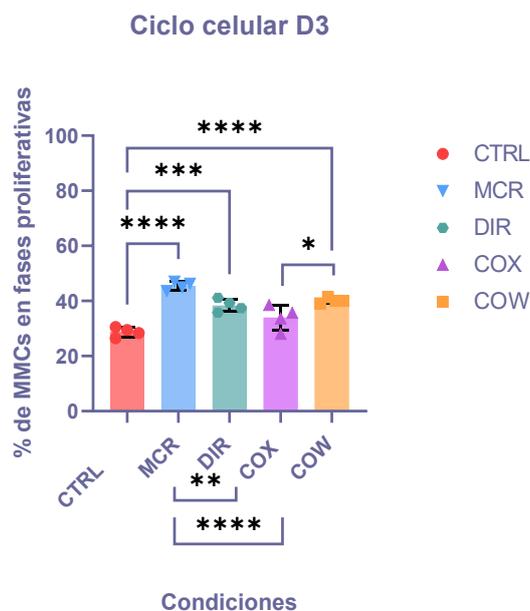


**Figura 18.** Ensayo MTS de proliferación de MMCs a 3, 5 y 7 días en las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW.

Es especialmente interesante comprobar que, a D3, solo existen diferencias significativas entre las condiciones CTRL y DIR y, sin embargo, a D5, CTRL se diferencia significativamente del resto de condiciones, demostrando así el efecto positivo tanto del microgel como del co-cultivo con hMSCs sobre la proliferación de las MMCs. Se vuelve a constatar, en este caso, que la presencia del microgel parece ser crucial para el cultivo de las MMCs como se observa en las condiciones MCR y COW. Ambas presentan diferencias estadísticamente significativas con el resto de condiciones a D7 (Figura 18), sin embargo, no las presentan entre ellas, sugiriendo, una vez más, que el efecto del microgel puede estar enmascarando el efecto del co-cultivo.

A D7 también se observan diferencias significativas entre las diversas de las condiciones; además, se constata que las condiciones MCR y COW son las que presentan una mayor proliferación celular (ya que presentan un número de células mayor) y DIR y COX las que presentan una menor proliferación. Por otro lado, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones CTRL y COX a D7. De toda esta información, se podría concluir que el efecto del microgel y del microgel combinado con el co-cultivo lleva a aumentar en gran medida la proliferación de las MMCs, siendo estos dos elementos clave. Por otro lado, se observa que el co-cultivo directo queda estancado en valores de número de MMCs alrededor de 400000 células ya que prácticamente no varía entre los días 3 y 7. Esto podría deberse al arresto de las MMCs en fases no proliferativas del ciclo celular a causa del contacto directo de las MMCs con las hMSCs, tal y como se ha mencionado previamente.

Destacar también que a la condición COW (Figura 18) es la única en que presenta diferencias estadísticamente significativas entre los días 5 y 7 (aunque todas las condiciones presentan diferencias significativas entre los días 3 y 5), reforzando así la hipótesis de que es una de las mejores condiciones de cultivo, puesto que favorece en gran medida la proliferación y viabilidad celular de las MMCs.



**Figura 19.** Ensayo de ciclo celular (proliferación celular) de MMCs realizado a día 3 en las condiciones CTRL, MCR, DIR, COX y COW.

Por su parte, el ensayo de ciclo celular a D3 (Figura 19) muestra que existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de células en fases proliferativas entre la condición CTRL y el resto de condiciones, excepto con la condición COX. En cambio, se observan diferencias significativas entre las condiciones MCR frente a DIR y COX y entre COX y COW; esto podría sugerir que el co-cultivo indirecto por sí solo no tiene un gran efecto positivo en la proliferación, pero, combinado con el microgel e, incluso, la acción del microgel por sí mismo, afectan positivamente a la proliferación de las MMCs, reforzando, una vez más, esta teoría (Klamer & Voermans, 2014).

Se concluye, tras el análisis de este co-cultivo, que el aumento de la frecuencia del cambio de medio a 2 días es necesario ya que, a diferencia de los cultivos previos, la viabilidad celular aumenta paulatinamente desde el D3 hasta el D7 en todas las condiciones. También se concluye, en vista a los resultados de estos cultivos, que las mejores condiciones para el cultivo de las MMCs con las condiciones MCR y COW.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) La fabricación de microesferas de alginato al 1,5% p/v y con un 5% p/ $\rho_{\text{Alg}}$  de nanopartículas de hierro puede realizarse empleando la microfluídica, puesto que se obtienen microesferas con una distribución estrecha de diámetros y la dispersión de las nanopartículas magnéticas en su interior es homogénea.
- 2) El método LbL es un método eficaz para la funcionalización de la microesfera de alginato ya que se consigue la retención de los polielectrolitos que representan la ECM. De hecho, puede realizarse con 3 pares diferentes de polielectrolitos de forma exitosa.
- 3) Se puede injertar colágeno sobre la superficie previamente funcionalizada con PLL de la microesfera de alginato empleando el entrecruzamiento covalente del glutaraldehído. Podría cambiarse la precapa previa o el protocolo para conseguir un mayor grado de injerto de colágeno sobre la superficie.
- 4) El co-cultivo indirecto es la aproximación elegida para posteriores ensayos ya que su manejo es más simple y parece que tiene mejores efectos sobre las MMCs, ya que el contacto directo entre MMCs y hMSCs produce arresto del ciclo celular en fases no proliferativas.
- 5) El microgel tiene efecto positivo sobre la viabilidad y proliferación celular y parece ser clave en el cultivo de las MMCs independientemente del efecto del co-cultivo.
- 6) Parece ser que el efecto del co-cultivo indirecto puede estar siendo enmascarado por el efecto positivo del microgel sobre las MMCs.
- 7) La proporción 1:1 MMCs:hMSCs ya estaba establecida en el grupo de investigación aunque en adelante podría considerarse aumentar el número de las hMSCs o disminuir las MMCs para paliar el efecto de enmascaramiento que tiene el microgel sobre el co-cultivo.
- 8) De igual forma, la cantidad de células en el pocillo obliga a realizar cambios de medio más frecuentes, que podrían enmascarar el efecto del co-cultivo. Cambiar los números de células de partida parece una buena solución.
- 9) MCR y COW son las condiciones de cultivo que presentan los mejores resultados de viabilidad y proliferación, por lo que de cara a validar la plataforma en un futuro se emplearán solo estas dos condiciones tanto con otras líneas celulares como con células de pacientes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ABARRATEGI, A., MIAN, S. A., PASSARO, D., ROUAULT-PIERRE, K., GREY, W., & BONNET, D. (2018). Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. En *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 215, Número 3, pp. 729-743). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20172139>
- ABCAM COMPANY. (2022). *ab139418 Propidium Iodide Flow Cytometry Kit for Cell Cycle Analysis*. [www.abcam.com/ab13418](http://www.abcam.com/ab13418)
- ALGERI, C., DONATO, L., & GIORNO, L. (2017). TYROSINASE IMMOBILIZED ON A HYDROPHOBIC MEMBRANE. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(1), 92-99. <https://doi.org/10.1002/bab.1462>
- ATCC. (2022). *RPMI 8226 CCL-155™*. [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
- BANCHEREAU, J., & ROUSSET, F. (1992). Human B lymphocytes: Phenotype, Proliferation, and Differentiation. En *ADVANCES IN IMMUNOLOGY* (Vol. 52).
- MARÍN PAYÁ, J. C. (2020). *3D CULTURE OF MULTIPLE MYELOMA CELL LINE USING MICROGEL ENVIRONMENTS* [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València.
- CLARA-TRUJILLO, S., FERRER, G. G., & RIBELLES, J. L. G. (2020). In vitro modeling of non-solid tumors: How far can tissue engineering go? En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 16, pp. 1-31). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165747>
- COWAN, A. J., GREEN, D. J., KWOK, M., LEE, S., COFFEY, D. G., HOLMBERG, L. A., TUAZON, S., GOPAL, A. K., & Libby, E. N. (2022). Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA*, 327(5), 464-477. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.0003>
- DA SILVA, C. M. L., SPINELLI, E., & RODRIGUES, S. V. (2015). Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 173, 619-623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
- DHODAPKAR, M. V. (2016). *Perspectives MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09>
- DOTMATICS. (2023). *GraphPad Prism*.
- FILLATREAU, S. (2018). Natural regulatory plasma cells. En *Current Opinion in Immunology* (Vol. 55, pp. 62-66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.012>
- GARCÍA-BRIEGA, M. I., RÓDENAS-ROCHINA, J., MARTINS, L. A., LANCEROS-MÉNDEZ, S., GALLEGO FERRER, G., SEMPERE, A., & GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2022). Stability of Biomimetically Functionalised Alginate Microspheres as 3D Support in Cell Cultures. *Polymers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/polym14204282>
- GE, B., WANG, H., LI, J., LIU, H., YIN, Y., ZHANG, N., & QIN, S. (2020). Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Marine Drugs*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/md18040178>

- GERECKE, C., FUHRMANN, S., STRIFLER, S., SCHMIDT-HIEBER, M., EINSELE, H., & KNOP, S. (2016). Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(27-28), 470-476. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0470>
- GOEL, U., USMANI, S., & KUMAR, S. (2022). Current approaches to management of newly diagnosed multiple myeloma. En *American Journal of Hematology* (Vol. 97, Número S1, pp. S3-S25). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ajh.26512>
- ISRAELS, E. D., & ISRAELS, L. G. (2000). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>
- KAFIENAH, W., & SIMS, T. J. (2004). Biochemical methods for the analysis of tissue-engineered cartilage. En *Hollander, A.P., Hatton, P.V. (eds) Biopolymer Methods in Tissue Engineering. Methods in Molecular Biology™* (Vol. 238).
- KAMALI, M., & GHAREMANINEZHAD, A. (2018). A study of calcium-silicate-hydrate/polymer nanocomposites fabricated using the layer-by-layer method. *Materials*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ma11040527>
- KIBLER, C., SCHERMUTZKI, F., WALLER, H. D., TIMPL, R., MÜLLER, C. A., & KLEIN, G. (1998). Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules. *Cell Adhesion and Communication*, 5(4), 307-323. <https://doi.org/10.3109/15419069809040300>
- KLAMER, S., & VOERMANS, C. (2014). The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/19336918.2014.968501>. En *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 8, Número 6, pp. 563-577). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.968501>
- KYLE, R. A., & RAJKUMAR, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. En *Leukemia* (Vol. 23, Número 1, pp. 3-9). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>
- LAROSA, C., SALERNO, M., DE LIMA, J. S., MERIJS MERI, R., DA SILVA, M. F., DE CARVALHO, L. B., & CONVERTI, A. (2018). Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 900-906. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.138>
- LEANE, M. M., NANKERVIS, R., SMITH, A., & ILLUM, L. (2004). Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1-2), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.023>
- LIU, Y., JELLOUL, F., ZHANG, Y., BHAVSAR, T., HO, C., RAO, M., LEWIS, N. E., CIMERA, R., BAIK, J., SIGLER, A., SEN, F., YABE, M., ROSHAL, M., LANDGREN, O., DOGAN, A., & XIAO, W. (2020). Genetic Basis of Extramedullary Plasmablastic Transformation of Multiple Myeloma. *American Journal of Surgical Pathology*, 44(6), 838-848. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001459>
- LTD, B. (2010). *Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay*. [www.biocolor.co.uk](http://www.biocolor.co.uk)

- LUCAS, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. En *Current opinion in hematology* (Vol. 28, Número 1, pp. 36-42). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000621>
- MARÍN-PAYÁ, J. C., CLARA-TRUJILLO, S., CORDÓN, L., GALLEGO FERRER, G., SEMPERE, A., & GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2022). Protein-Functionalized Microgel for Multiple Myeloma Cells' 3D Culture. *Biomedicines*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112797>
- MIAO, Q., LI, Q., TAN, W., MI, Y., MA, B., ZHANG, J., & GUO, Z. (2022). Preparation, Anticoagulant and Antioxidant Properties of Glucosamine-Heparin Salt. *Marine Drugs*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/md20100646>
- MILTENYI BIOTEC COMPANY. (2021). *Anexin V-FITC Kit instructions*. [https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document\\_ph6dh601a55sb08bso1tt7696l?content-disposition=inline](https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document_ph6dh601a55sb08bso1tt7696l?content-disposition=inline)
- MITSIADES, C. S., MITSIADES, N., MUNSHI, N. C., & ANDERSON, K. C. (2004). *Focus on multiple myeloma*. 6.
- MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., & REHMAN, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. En *Applied Spectroscopy Reviews* (Vol. 43, Número 2, pp. 134-179). <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- MÜLLER, M. (2020). Anomalous influence of salt concentration on deposition of poly(L-lysine)/cellulose sulfate multilayers evidenced by in situ ATR-FTIR. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102336>
- NEFEDOVA, Y., LANDOWSKI, T. H., & DALTON, W. S. (2003). Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*, 17(6), 1175-1182. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402924>
- PIOLI, P. D. (2019). Plasma Cells, the Next Generation: Beyond Antibody Secretion. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02768>
- PROMOCELL. (2022). *Mesenchymal Stem Cells Instruction Manual*. [www.promocell.com/coa](http://www.promocell.com/coa)
- RAJKUMAR, S. V. (2019). Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematological Oncology*, 37(S1), 62-65. <https://doi.org/10.1002/hon.2586>
- RIEDL, A., SCHLEDERER, M., PUDELKO, K., STADLER, M., WALTER, S., UNTERLEUTHNER, D., UNGER, C., KRAMER, N., HENGSTSCHLÄGER, M., KENNER, L., PFEIFFER, D., KRUPITZA, G., & DOLZNIG, H. (2017). Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *Journal of Cell Science*, 130(1), 203-218. <https://doi.org/10.1242/jcs.188102>
- SEBO, Z. L., RENDINA-RUEDY, E., ABLES, G. P., LINDSKOG, D. M., RODEHEFFER, M. S., FAZELI, P. K., & HOROWITZ, M. C. (2019). Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications. En *Endocrine Reviews* (Vol. 40, Número 5, pp. 1187-1206). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00138>
- TURKU BIOSCIENCE. (2018). *Flowing Software 2*.

- UNAL, S., ARSLAN, S., YILMAZ, B. K., OKTAR, F. N., FICAI, D., FICAI, A., & GUNDUZ, O. (2020). Polycaprolactone/gelatin/hyaluronic acid electrospun scaffolds to mimic glioblastoma extracellular matrix. *Materials*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/ma13112661>
- VINCENT, T., & MECHTI, N. (2005). Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. En *Leukemia and Lymphoma* (Vol. 46, Número 6, pp. 803-811). <https://doi.org/10.1080/10428190500051448>
- WANG, H., WANG, L., CHI, P. D., WANG, W. DA, CHEN, X. Q., GENG, Q. R., XIA, Z. J., & LU, Y. (2016). High level of interleukin-10 in serum predicts poor prognosis in multiple myeloma. *British Journal of Cancer*, *114*(4), 463-468. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.11>
- ZHOU, F. Z., CHANG, Y. H., HU, C. C., & CHIU, T. C. (2022). Sodium-Alginate-Functionalized Silver Nanoparticles for Colorimetric Detection of Dimethoate. *Biosensors*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/bios12121086>

## 7. ANEXO

### 7.1. OBJETIVOS DEL DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

Relación del trabajo con los Objetivos del Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

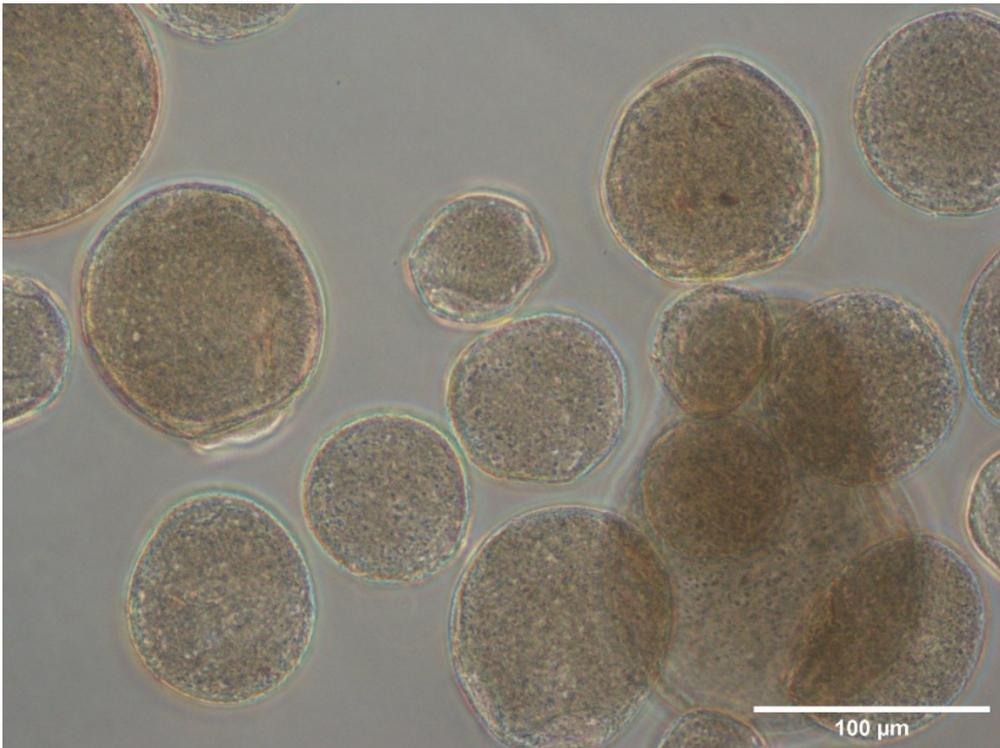
*Tabla 1. Relación del presente trabajo con los Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030.*

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenibles</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza.				<b>X</b>
ODS 2. Hambre cero.				<b>X</b>
ODS 3. Salud y bienestar.	<b>X</b>			
ODS 4. Educación de calidad.				<b>X</b>
ODS 5. Igualdad de género.				<b>X</b>
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				<b>X</b>
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				<b>X</b>
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				<b>X</b>
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		<b>X</b>		<b>X</b>
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				<b>X</b>
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				<b>X</b>
ODS 12. Producción y consumo responsable.				<b>X</b>
ODS 13. Acción por el clima.				<b>X</b>
ODS 14. Vida submarina.				<b>X</b>
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				<b>X</b>
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				<b>X</b>
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				<b>X</b>

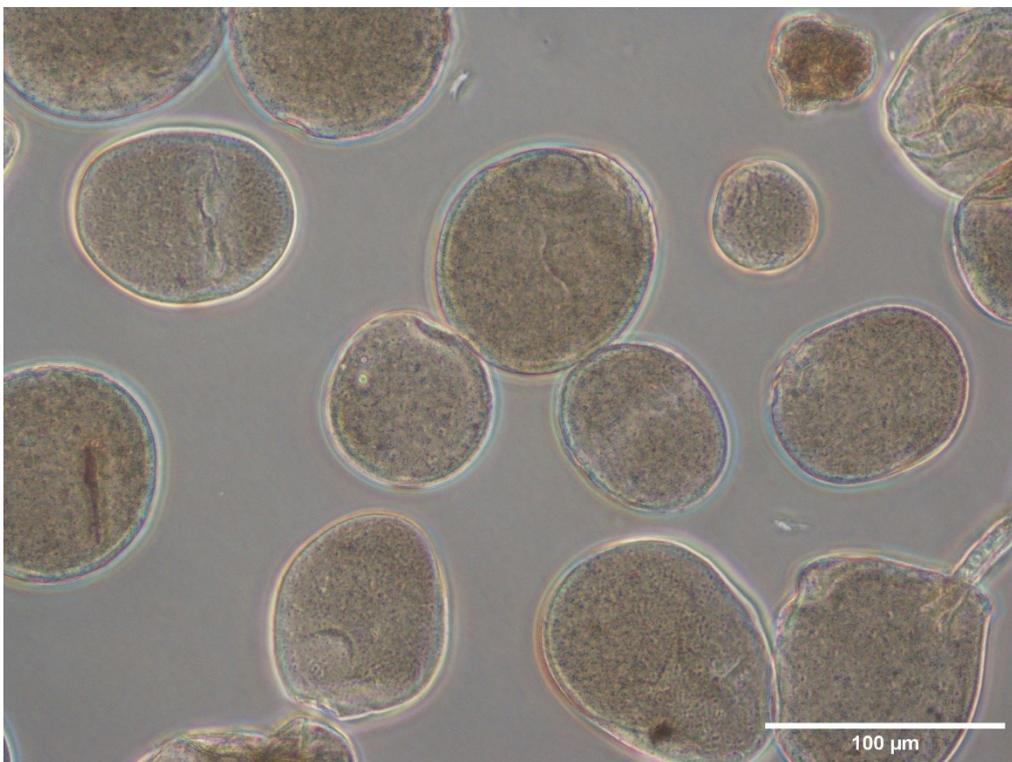
El presente trabajo cumple con los ODS 3. Salud y bienestar y 9. Industria, innovación e infraestructuras.

En este trabajo se busca desarrollar una plataforma de cultivo 3D para mieloma múltiple que mimetice el nicho donde se desarrolla la neoplasia con el objetivo último del testeo de fármacos en células de pacientes. De esta manera, se relaciona directamente con el ODS 3) salud y bienestar. Por otro lado, se busca la optimización y estandarización del desarrollo de la plataforma de cultivo de manera que se pueda comercializar en un futuro, y es por ello por lo que cumple la ODS 9) en un grado medio, puesto que aún es necesario realizar ajustes a la plataforma antes de su llegada al mercado.

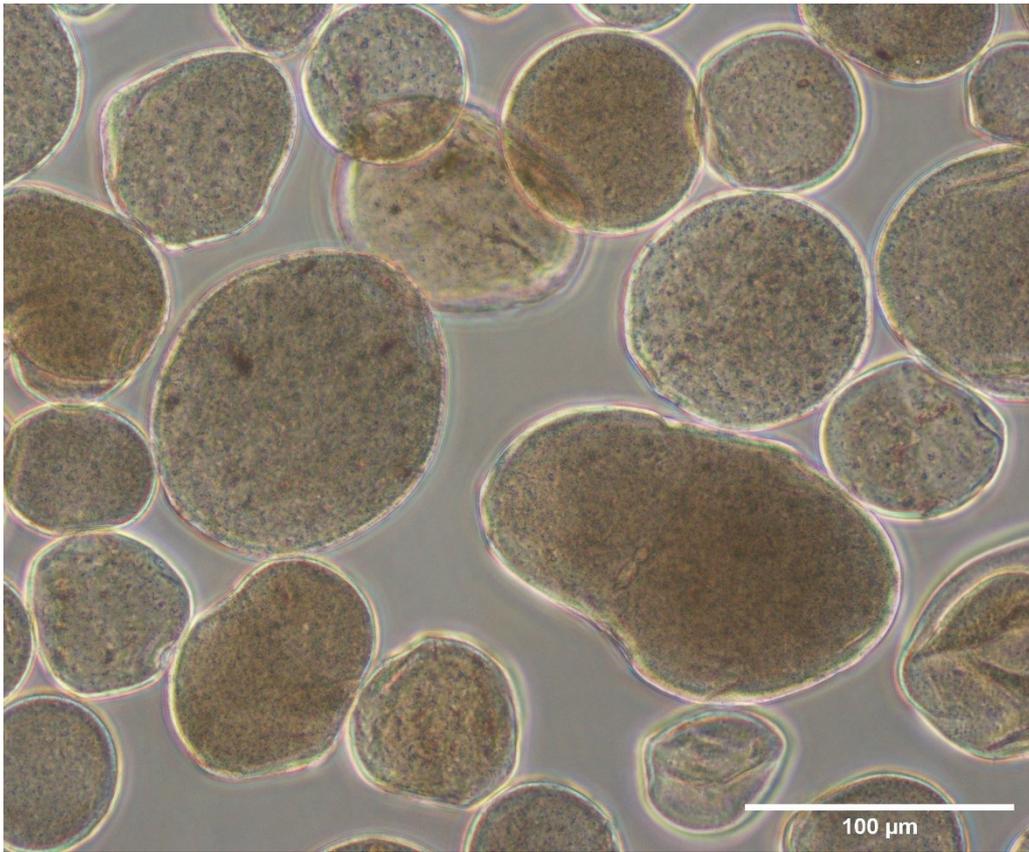
## 7.2. IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA COMPLEMENTARIAS



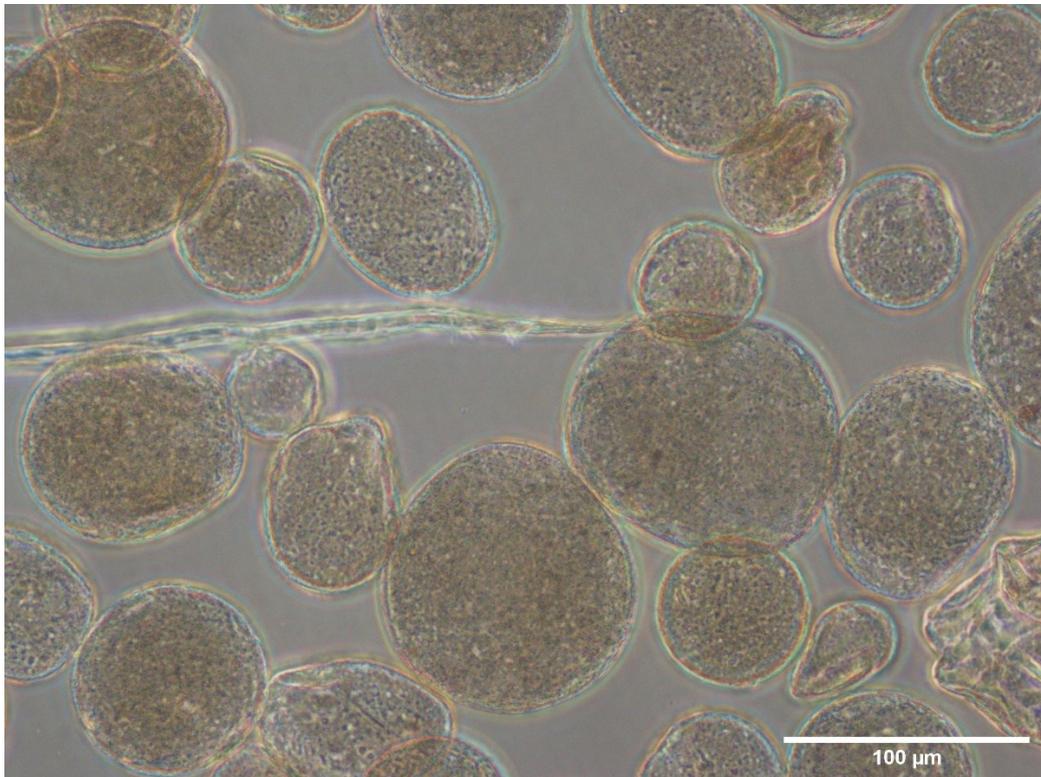
**Figura 20.** Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/CS a una escala de 100 μm.



**Figura 21.** Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/Hep a una escala de 100 μm.

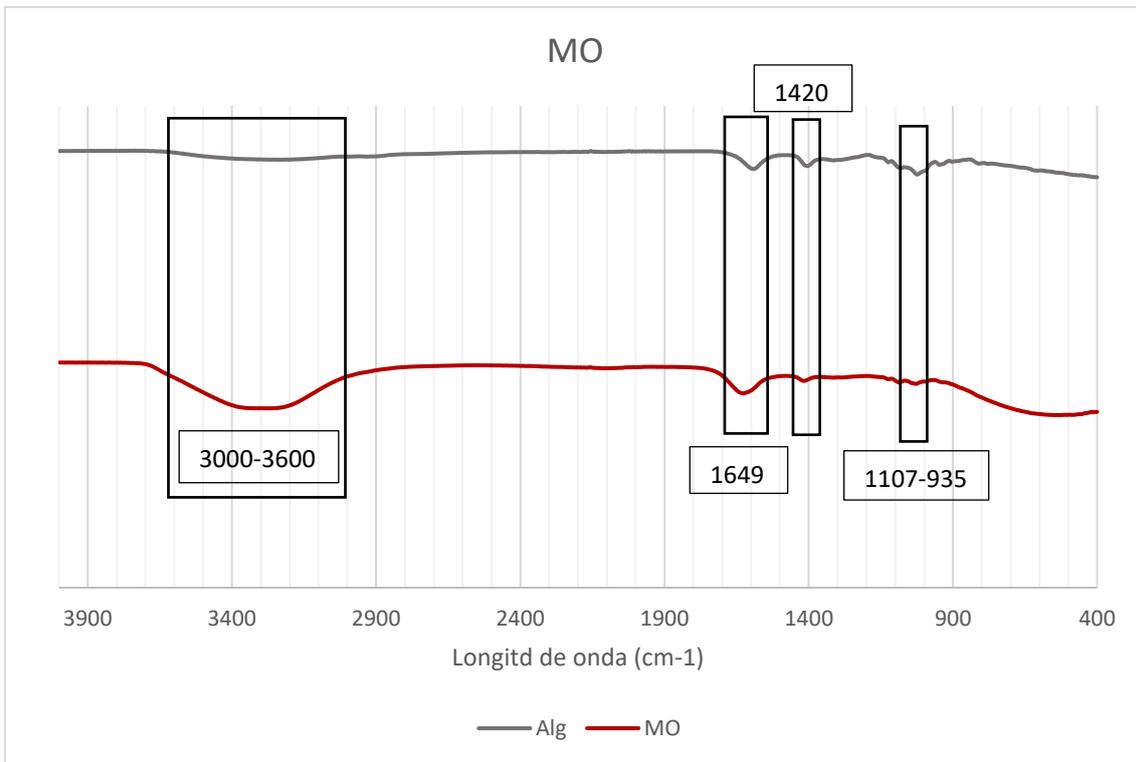


**Figura 22.** Imagen de microscopía óptica de las MO con LbL PLL/HA a una escala de 100 μm.

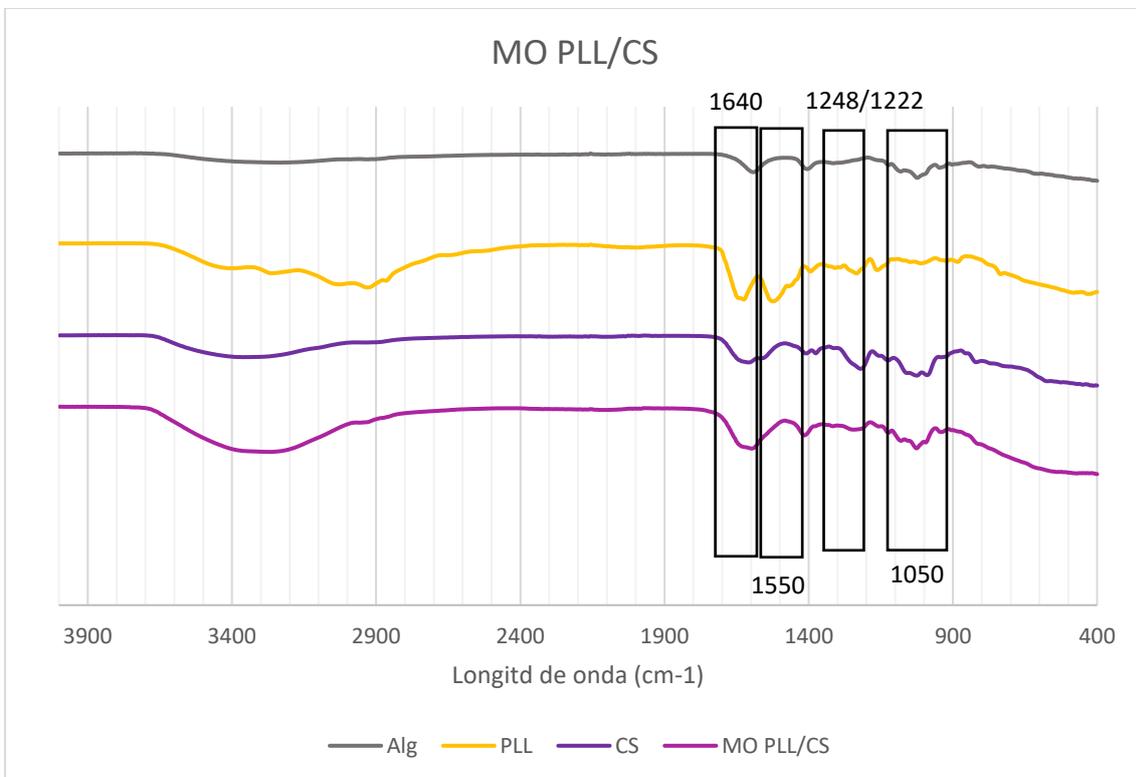


**Figura 23.** Imagen de microscopía de las MO con LbL Col I a una escala de 100 μm.

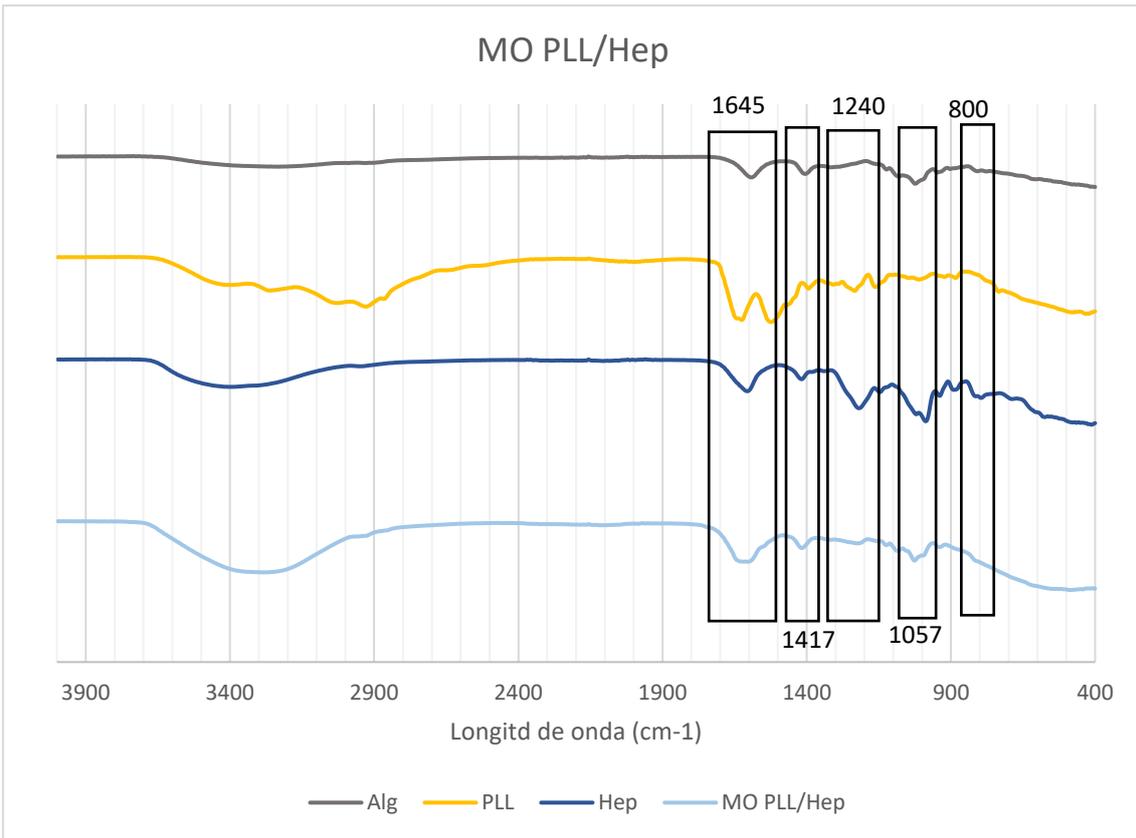
### 7.3. FIGURAS COMPLEMENTARIAS AL ANÁLISIS FTIR



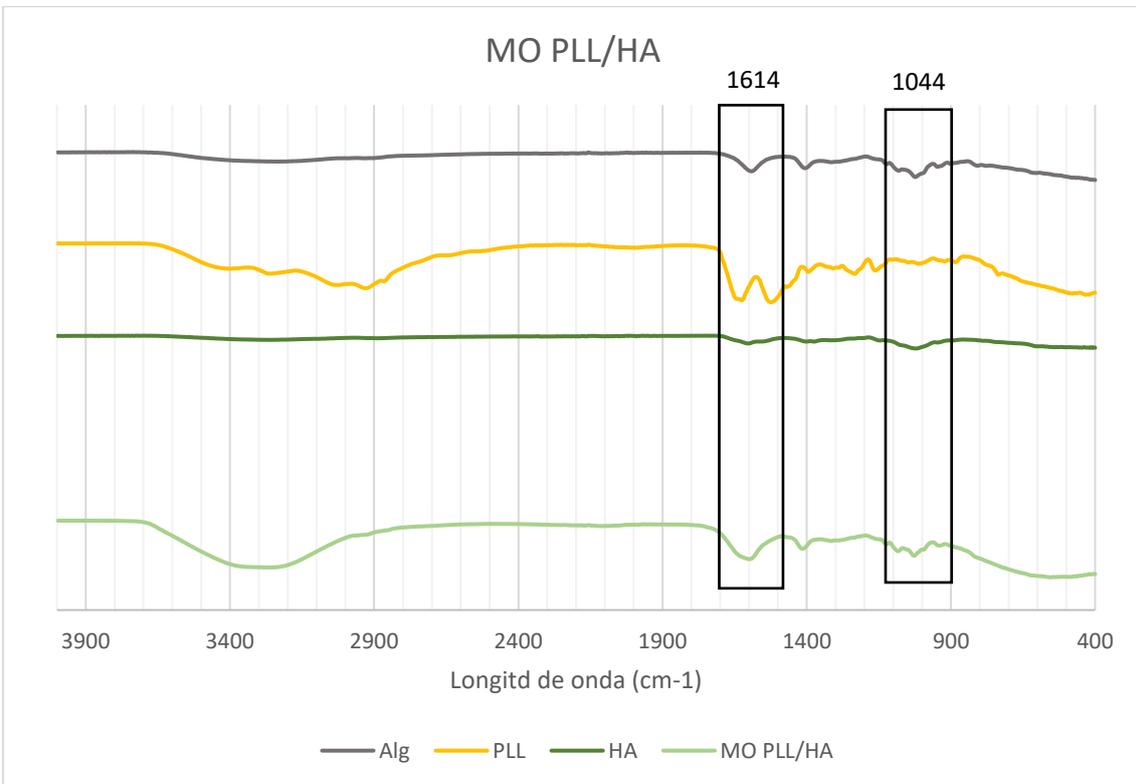
**Figura 24.** Espectro de FTIR del alginato y de las MO no funcionalizadas.



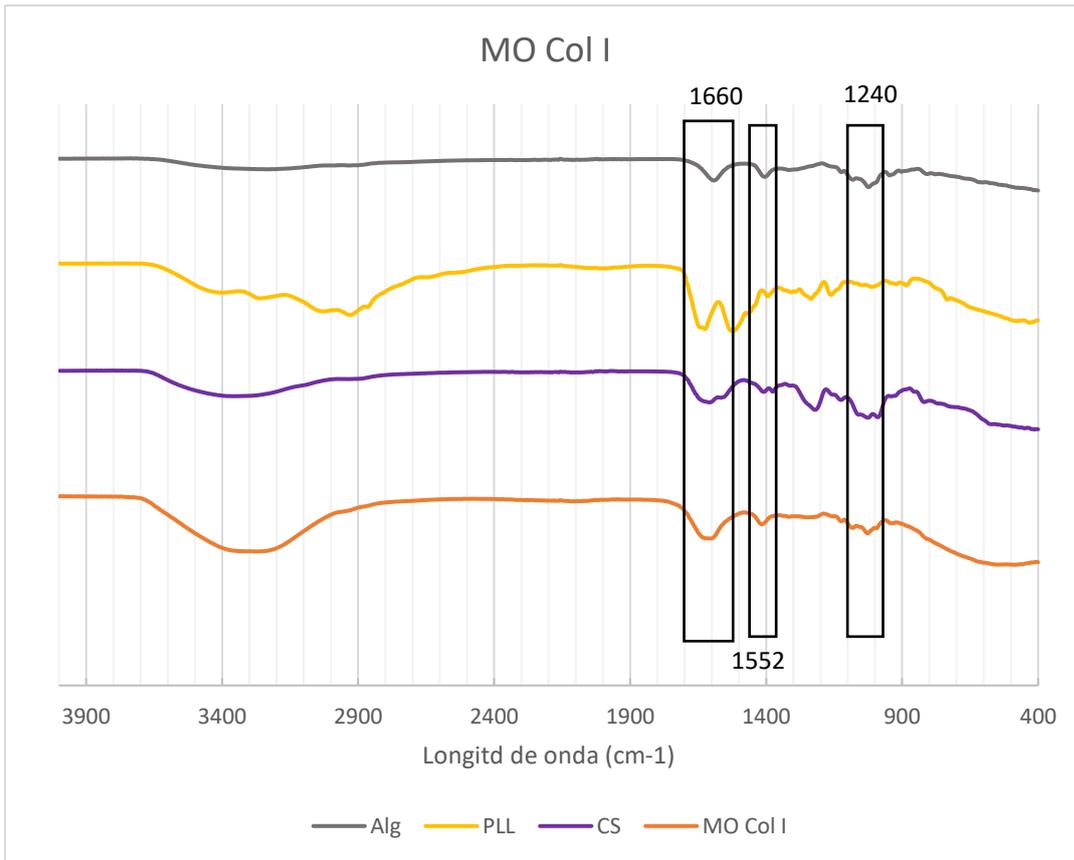
**Figura 25.** Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/CS.



**Figura 26.** Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/Hep.



**Figura 27.** Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO PLL/HA.



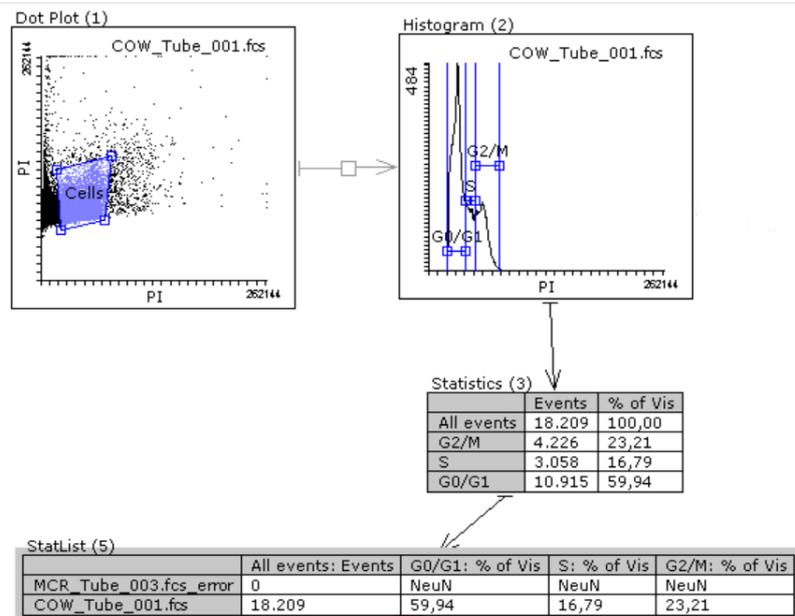
**Figura 28.** Espectro de FTIR del Alg, PLL, CS y de las MO Col I.

No se tiene un espectro del colágeno puro, puesto que en el CBIT no se dispone del compuesto en polvo.

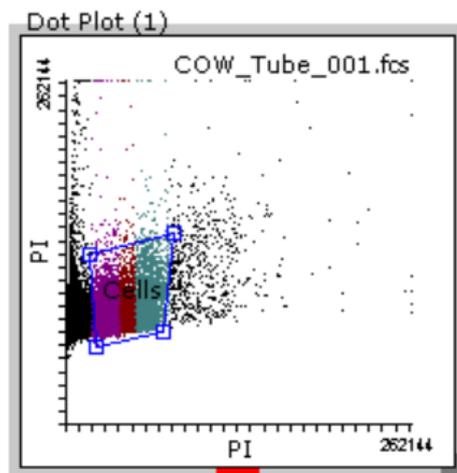
## 7.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

### 7.4.1. CICLO CELULAR

Para el análisis de ciclo celular, se siguen los pasos que se muestran en la Figura 29. En primer lugar, se genera un DotPlot representando el pico del yoduro de propidio frente a la altura y se dibuja una región que se corresponde con las células y se descarta el debris. A continuación, se genera un histograma y se muestran tan solo los datos correspondientes a las células para delimitar las regiones de las poblaciones celulares en fases G0/G1, S y G2/M. Finalmente se crea una lista que recopile los diferentes porcentajes de cada población.



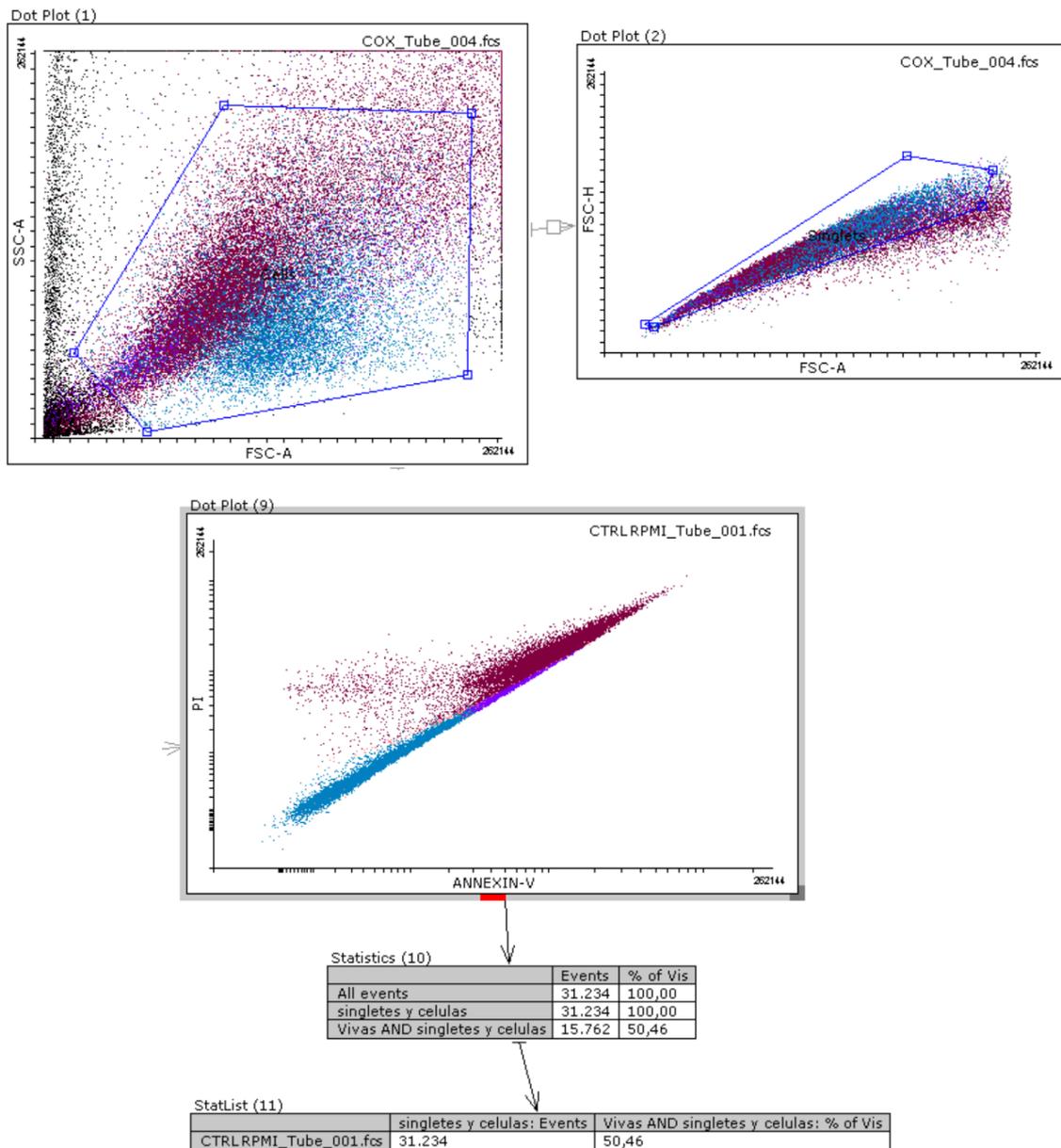
**Figura 29.** Análisis de los datos de ciclo celular con el software Flowing. Se muestra en morado los datos que se corresponden a las células.



**Figura 30.** Detalle del DotPlot obtenido al representar los datos de ciclo celular. Se muestra la región de correspondiente a las células y, dentro de esta, las fases G0/G1 en morado, S granate y G2/M azul.

## 7.4.2. APOPTOSIS

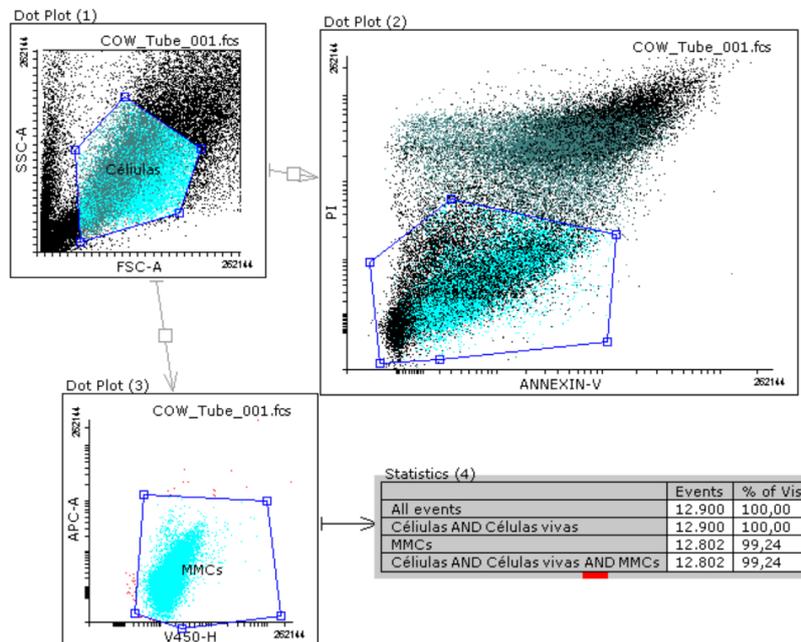
Para el análisis de los datos de apoptosis se siguen los pasos de la Figura 31. En primer lugar, se genera un DotPlot donde se representa Side Scatter vs. Forward donde se crea una región que comprende las células y se descarta el debris. Se genera un nuevo DotPlot (altura vs. área) representando únicamente las células y se seleccionan los singletes mediante el dibujo de una región, descartando así los posibles dobletes. Se unen los dos eventos generados en ambos dotplots (células y singletes) y se representan en un nuevo DotPlot del área del pico de Anexina V frente a la altura, donde se delimitan 3 regiones correspondientes a las 3 poblaciones celulares (células y singletes, muertas y apoptóticas) según si son PI+, PI-, Anexina V+ o Anexina-. Finalmente, se crea una tabla que recoge los datos obtenidos del análisis que se transfieren a una hoja Excel para su análisis.



**Figura 31.** Análisis de los datos de apoptosis con el software Flowing. Se muestran en morado los datos que se corresponden a las células apoptóticas; en azul los correspondientes a las células vivas que sean singletes y en granate las muertas.

### 7.4.3. PORCENTAJE DE MMCs EN LAS MUESTRAS DEL CULTIVO

Para constatar que el porcentaje de hMSCs en las muestras de los cultivos celulares no supera el 5% de la muestra, se realiza el análisis que se muestra en la Figura 32. En primer lugar, se genera un DotPlot representando Side Scatter vs. Forward donde se crea una región que delimita las células y se descarta el debris. Se genera un nuevo DotPlot PI vs. Annexina V donde se muestran todos los eventos, y se crea una nueva región que comprenda las células vivas. A continuación, se crea un nuevo DotPlot (marcadores CD73 vs. CD138) conectado al primero donde se muestran tan solo eventos que sean células y que estén vivas y se crea una región correspondiente a las MMCs. Tras ello, se muestran los eventos que cumplen los requisitos “células”, “células vivas” y “MMCs” de color azul. En una StatList se recogen los % de MMCs de cada muestra, comprobando que en ninguna de ellas el porcentaje de MMCs sea menor a un 95%, lo que indica que menos de un 5% de las células de la muestra son hMSCs.



**Figura 32.** Análisis del % de cada tipo celular (MMCs y hMSCs) en las muestras de apoptosis y ciclo celular.