



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

**TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

# **DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE**

AUTORA: MARÍA INMACULADA GARCÍA BRIEGA

TUTOR: JOSÉ LUÍS GÓMEZ RIBELLES

COTUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

**Curso Académico: 2020-21**

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis tutores, el Dr. José Luís Gómez Ribelles y la Dra. Gloria Gallego Ferrer por mantener la confianza en mí y darme la oportunidad de seguir trabajando en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universitat Politècnica de València. Estaré eternamente agradecida por permitirme desarrollar este Trabajo Final de Máster y sentar las bases de lo que será mi tesis doctoral, así como por el apoyo incondicional que me han ofrecido durante todo el proceso.*

*Quisiera dar las gracias además a todo el personal y compañeros del CBIT, por mantener la esencia del centro pese a las dificultades existentes. Gracias por crear un espacio en el que trabajar cómoda y en el que poder crecer y disfrutar de la ciencia como jamás imaginé. De hecho, me gustaría mencionar con especial cariño a Julio Rodríguez y Estela Sánchez, por apoyarme siempre que lo he necesitado y a Ximo Ródenas, Sandra Clara y María Guillot por ayudarme a crecer tanto dentro como fuera del laboratorio.*

*Por otra parte, quisiera agradecer a Mireia Costa por estos 5 años de aventura, y los que quedan. También a Jorge Calatayud, César Herrera y Alba Peiró, que pese a no entender nada del campo, jamás han dicho que no a escucharme hablar emocionada de lo que había aprendido ese día (o de lo que había salido regular). Por supuesto, no podía faltar dejar constancia de lo agradecida que estoy a José Almodóvar, que apareció en mi vida cuando más falta me hacía y me ha permitido ver todo lo que había bien cuando yo solo veía lo malo.*

*Finalmente, nunca viviré lo suficiente para agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado y que sé que me darán en el futuro.*

*Gracias a todos ellos estoy aquí, dispuesta a defender este proyecto y a trabajar por vivir de lo que me apasiona, la ciencia.*

*Este trabajo ha sido financiado con fondos del proyecto Microgeles Biomiméticos para el estudio de la generación de resistencias a fármacos en el Mieloma Múltiple. Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad PID2019-106099RB-C41*

## **RESUMEN**

El proyecto busca producir, caracterizar y validar una plataforma de cultivo *in vitro* que permita reproducir el comportamiento *in vivo* de las células tumorales del Mieloma Múltiple e investigar la influencia de diferentes biomateriales en el desarrollo de estas células.

La plataforma de cultivo consiste en un microgel capaz de recrear la matriz extracelular de la médula ósea. Este microgel está basado en una suspensión de microesferas y células en un medio líquido, mantenido mediante una agitación suave proporcionada por un agitador rotacional. El uso novedoso de criotubos para el cultivo permite trabajar con volúmenes pequeños de células y microesferas en la suspensión manteniendo el entorno biomimético y la tridimensionalidad.

Para la producción de la plataforma de cultivo se fabrican microesferas de alginato mediante un sistema de microfluídica. Estas microesferas serán la base del sistema, y para realizar el cultivo, serán funcionalizadas de formas diferentes. La funcionalización se realizará mediante el proceso de *Layer by Layer*, con el cual se generan 3 bicapas de polielectrolitos cargados positiva y negativamente, que alternados, se mantienen unidos por las fuerzas electrostáticas. La última capa de estos recubrimiento presentará a las células biomoléculas presentes en la matriz extracelular de la médula ósea. Los pares de materiales estudiados serán: gelatina y alginato, poli-L-Lisina y alginato y heparina y quitosano.

Para caracterizar la plataforma, se emplean técnicas de microscopía óptica y electrónica, espectrofotometrías y otras técnicas bioquímicas. De igual forma, para validarla, se realiza un cultivo de una línea celular de mieloma múltiple (RPMI 8226) en el entorno tridimensional desarrollado y los resultados son analizados cuantificando la proliferación empleando la medida del ADN total.

## **RESUM**

El projecte busca produir, caracteritzar i validar una plataforma de cultiu *in vitro* que permeta reproduir el comportament *in vivo* de les cèl·lules tumorals del Mieloma Múltiple i investigar la influència de diferents biomaterials en el desenvolupament d'aquestes cèl·lules.

La plataforma de cultiu consisteix en un microgel capaç de recrear la matriu extracel·lular de la medul·la òssia. Aquest microgel està basat en una suspensió de microesferes i cèl·lules en un mig líquid, mantingut mitjançant una agitació suau proporcionada per un agitador rotacional. L'ús nou de criotubs per al cultiu permet treballar amb volums menuts de cèl·lules i microesferes en la suspensió mantenint l'entorn biomimètic i la tridimensionalitat.

Per a la producció de la plataforma de cultiu es fabriquen microesferes d'alginat mitjançant un sistema de microfluídica. Aquestes microesferes seran la base del sistema, i per a realitzar el cultiu, seran funcionalitzades de formes diferents. La funcionalització es realitzarà mitjançant el procés de *Layer by Layer*, amb el qual es generen 3 bicapes de polielectrolits carregats positiva i negativament, que alternats, es mantenen units per les forces electroestàtiques. L'última capa d'aquests recobriment presentarà a les cèl·lules biomolècules presents en la matriu extracel·lular de la medul·la òssia. Els parells de materials estudiats seran: gelatina i alginat, poli-L-Lisina i alginat i heparina i quitosà.

Per a caracteritzar la plataforma, s'empren tècniques de microscòpia òptica i electrònica, espectrofotometries i altres tècniques bioquímiques. D'igual forma, per a validar-la, es realitza un cultiu d'una línia cel·lular de mieloma múltiple (RPMI 8226) en l'entorn tridimensional desenvolupat i els resultats són analitzats quantificant la proliferació emprant la mesura de l'ADN total.

## **ABSTRACT**

The project aims to produce, characterize and validate an in vitro culture platform to reproduce the in vivo behavior of Multiple Myeloma tumor cells and to investigate the influence of different biomaterials on the development of these cells.

The culture platform consists of a microgel capable of recreating the extracellular matrix of the bone marrow. This microgel is based on a suspension of microspheres and cells in a liquid medium, maintained by gentle agitation provided by a rotational shaker. The novel use of cryotubes for culture allows working with small volumes of cells and microspheres in the suspension while maintaining the biomimetic environment and three-dimensionality.

To produce the culture platform, alginate microspheres are manufactured using a microfluidic system. These microspheres will be the basis of the system and will be functionalized in different ways in order to carry out the culture. The functionalization will be carried out using the Layer by Layer process, which generates 3 bilayers of positively and negatively charged polyelectrolytes, which are alternately held together by electrostatic forces. The last layer of these coatings will present the biomolecules present in the extracellular matrix of the bone marrow. The pairs of materials studied will be: gelatin and alginate, poly-L-lysine and alginate, and heparin and chitosan.

Optical and electron microscopy techniques, spectrophotometry, and other biochemical techniques will be used to characterize the platform. Similarly, to validate it, a multiple myeloma cell line (RPMI 8226) is cultured in the three-dimensional environment developed and the results are analyzed by quantifying proliferation using total DNA measurement.

## ÍNDICE GENERAL

### Documentos contenidos en el TFM

- Documento I: Memoria
- Documento II: Presupuesto

### DOCUMENTO I: MEMORIA

1. MOTIVACIÓN
2. OBJETIVOS
3. ANTECEDENTES
4. JUSTIFICACIÓN
5. NORMATIVA
6. METODOLOGÍA
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

### DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN
2. CUADRO 1: MANO DE OBRA
3. CUADRO 2: MATERIALES
4. CUADRO 3: MAQUINARIA
5. CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS
6. PRESUPUESTOS PARCIALES
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN DE MATERIAL

# **DOCUMENTO I:**

# **MEMORIA**



## ÍNDICE DE LA MEMORIA

AGRADECIMIENTOS.....	3
1. MOTIVACIÓN.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1. Mieloma múltiple.....	19
3.2. La médula ósea.....	20
3.3. Modelos actuales para el cultivo celular.....	22
3.4. Microgeles.....	23
3.4.1. Microfluídica.....	24
3.5. Materiales para las microesferas.....	25
3.5.1. Material de soporte.....	26
3.5.2. Formas de obtención.....	26
3.5.3. Funcionalización de las microesferas.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	31
5. NORMATIVA.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1. Materiales.....	32
6.2. Preparación microesferas de alginato.....	33
6.3. Funcionalización de microesferas.....	36
6.3.1. LBL Gelatina-Alginato-Gelatina (LBL Gel-Alg).....	37
6.3.2. LBL Quitosano-Heparina, Chi-Hep.....	38
6.3.3. LBL Poli-L-Lisina-Alginato (LBL PLL-Alg).....	39
6.4. Caracterización morfológica.....	40
6.4.1. Microscopía óptica.....	40
6.4.2. CrioFESEM.....	41
6.5. Caracterización bioquímica.....	42
6.5.1. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).....	42
6.5.2. Análisis termogravimétrico (TGA).....	42
6.5.3. BCA.....	43
6.5.4. BLYSCAN.....	43
6.5.5. NINHIDRINA.....	44
6.6. Prueba de estabilidad.....	44
6.7. Cultivo celular.....	45
6.7.1. Descongelado de células y expansión.....	46
6.7.2. Esterilización de materiales.....	47

6.7.3.	Cultivo celular.....	48
6.7.4.	Proliferación .....	49
7.	RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	51
7.1.	Microesferas de alginato (mo alginato) .....	52
7.2.	Microesferas de alginato con LBL de Gel-Alg-Gel (mo LBL GEL-ALG) .....	57
7.3.	Microesferas de alginato con LBL de Chi-Hep 3 bicapas (mo LBL Chi-Hep).....	64
7.4.	Microesferas de alginato con LBL de PLL-Alg 2 bicapas.....	70
7.5.	Cultivo células RPMI 8226 .....	73
8.	CONCLUSIONES .....	75
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la plataforma de cultivo propuesta. Realizado por la autora con PowerPoint.....	18
Figura 2. Esquema comparativo entre tejido sano y mieloma múltiple. Realizado por la autora empleando Biorender .....	19
Figura 3. Esquema del microentorno de la médula ósea. Vía Méndez-Ferrer et al. 2020. (Méndez-Ferrer et al., 2020) .....	21
Figura 4. Aplicaciones de los microgeles en función de la organización: A) la encapsulación 3D, B) la expansión celular, C) transporte de sustancias in vivo, D) Scaffolds simples ensamblados, F) Scaffolds de mayor orden ensamblaos y E) Formas de tipo "cerradura y llave". Vía Caldwell et al. 2020 (Caldwell et al., 2020).....	24
Figura 5. Principales formas de obtención de droplets por microfluídica. Realizado por la autora empleando PowerPoint.....	25
Figura 6. Estructura química del alginato. A) monómeros y B) combinaciones posibles. Vía Ayarza et al. 2014 (Ayarza, 2014).....	26
Figura 7. Enlace iónico por calcio de las cadenas de alginato, dango lugar a la gelificación del material. Vía Ayarza et al. 2014 .....	27
Figura 8. Esquema generalista del proceso de LBL. Realizado por la autora empleando imágenes de Servier Medical Art .....	28
Figura 9. Estructura química de la gelatina. Vía Reye-Ortega et al. (Reyes-Ortega et al., 2012) 29	
Figura 10. Estructura química de la heparina. Vía Wikipedia (Wikipedia community, n.d.) .....	29
Figura 11. Estructura química del quitosano. Vía Wikipedia (Wikimedia Commons, n.d.) .....	30
Figura 12. Estructura química de la lisina y la poli-L-lisina. Vía (Ryou et al., 2011) .....	30
Figura 13. Sistema de microfluídica empleado en la síntesis de microesferas de alginato. El medio continuo es el amarillo y el discontinuo el blanco. Realizado por la autora empleando PowerPoint.....	34
Figura 14. Montaje para la obtención de microesferas.....	35
Figura 15. Colocación de las disoluciones para el LBL. Realizado por la autora con imágenes de Server Medical Art.....	36
Figura 16. Esquema de las series de cultivo y componentes. Realizado por la autora empleando PowerPoint.....	46
Figura 17. Tamaños de microesferas en función de los flujos continuo y discontinuo .....	52
Figura 18. Microesferas de alginato sintetizadas con el montaje experimental explicado en el apartado de materiales y métodos y un flujo de medio continuo de 19,38 mL/h y 1,55 mL/h de discontinuo.....	54
Figura 19. Microesferas de alginato obtenidas por microfluídica usando 50,5 mL/h en el medio continuo y 0,8 en el discontinuo A) sin tubo coaxial con bajo pH y B) con el tubo coaxial con bajo pH .....	54

Figura 20. A) Imagen a 250 aumentos de una microesfera de alginato. B) Detalle a 2000 aumentos de la superficie de las microesferas de alginato .....	55
Figura 21. Microesferas de alginato tras 1h en los medios A) Agua Ph 7, B) Agua Ph 5,5 0,25 NaCl, C) EDTA, D) Alginato 1%p/v. Barra de dimensión de 100 $\mu$ m. ....	56
Figura 22. Microesferas de alginato tras 1 día A) RPMI 1640 y tras 7 días en B) Heparina 1% p/v 0,25 NaCl, C) Gelatina 1% p/v y D) PLL 1% p/v. Barra de escala de 100 $\mu$ m.....	56
Figura 23. Microesferas de alginato tras A) 1h y B) 7 días en quitosano. Barra de escala de 100 $\mu$ m .....	57
Figura 24. A) Microesfera LBL de Gel-Alg B) Detalle de la superficie de las microesferas de LBL de Gel-Alg .....	58
Figura 25. Microesferas LBL Gel-Alg tras 7 días en A) RPMI 1640 y B) EDTA. Barra de escala de 100 $\mu$ m .....	59
Figura 26. Microesferas LBL Gel-Alg-Gel tras 7 días en alginato 1%.....	59
Figura 27. Microesfera LBL Chi-Hep 3 bicapas .....	64
Figura 28. Imagen y detalle de dos microesferas con LBL Chi-Hep 3 bicapas. A) Visión de dos microesferas y B) detalle del recuadro de la imagen A.....	65
Figura 29. Microesferas LBL Chi-Hep 3B tras 7 días en A) EDTA , B)RPMI 1640 ,C) Quitosano, D) Heparina. Barra de escala de 100 $\mu$ m .....	66
Figura 30. Microesferas de alginato y su autofluorescencia y microesferas LBL Chi-Hep 3B.....	68
Figura 31. Microesferas de PLL-Alg 2 bicapas tras 7 días en A) alginato 1% B) RPMI 1640 C) EDTA. Barra de escala 100 $\mu$ m .....	70
Figura 32. Mo alginato (derecha) y mo LBL PLL-Alg (izquierda) tras el tratamiento con ninhidrina .....	73
Figura 33. Imagen a 100 aumentos de las células interactuando con el microgel LBL.....	74

## ÍNDICE DE LA GRÁFICAS

Gráfica 1. Espectro FTIR mo LBL Gel-Alg y sus picos característicos.....	60
Gráfica 2. A) Pérdida de peso de la mo alginato húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo alginato C) Derivada de la degradación del peso en seco de las mo de alginato.....	61
Gráfica 3. A) Pérdida de peso de la mo LBL Gel-Alg húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL Gel-Alg C) Derivada de la degradación del peso de las mo LBL Gel-Alg por TGA.....	62
Gráfica 4. Cuantificación por BCA de la proteína gelatina en las microesferas (***) $p < 0,001$ ..	63
Gráfica 5. Espectro FTIR mo LBL Chi-Hep y sus picos característicos.....	66
Gráfica 6. A) Pérdida de peso de la mo LBL Chi-Hep húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL Chi-Hep C) Derivada de la degradación del peso de las mo LBL Chi-Hep por TGA.....	67
Gráfica 7. Resultados del Blyscan para cuantificar el GAG heparina .....	69
Gráfica 8. A) Pérdida de peso de la mo LBL PLL-Alg húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL PLL-Alg C) Evolución de la degradación de las mo LBL PLL-Alg por TGA .....	71
Gráfica 9. Espectro FTIR mo PLL-Alg y sus picos característicos .....	72
Gráfica 10. Gráfica resultados PicoGreen para los sobrenadantes a 3 y 5 días (**** $P < 0,0001$ ) .....	74
Gráfica 11. Gráfica resultados PicoGreen para los tubos a 3 y 5 días.....	75

## ÍNDICE DE LA TABLAS

Tabla 1. Distribución de tiempos de las fases del LBL.....	36
Tabla 2. Resumen de los aspectos más importantes de cada microesfera realizado en el presente TFM .....	40
Tabla 3. Condiciones y pruebas del ensayo de estabilidad.....	45
Tabla 4. Composición de los estándares para la curva del PicoGreen.....	50
Tabla 5. Rango de tamaños de las microesferas de alginato .....	53

## ÍNDICE DE LA ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
MM	Mieloma múltiple
PC	Célula plasmática
HSC	Célula madre hematopoyética
MGUS	Gammapatía monoclonal de significado incierto
OMS	Organización Mundial de la Salud
BM	Médula ósea
MSC	Célula madre mesenquimal
ECM	Matriz extracelular
FN	Fibronectina
HA	Ácido hialurónico
MMC	Célula de mieloma múltiple
IL	Interleuquinas
GAG	Glucosaminoglicano
Alg	Alginato
mo	Microesfera
LBL	Layer by Layer
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro
NHS	N-Hidroxisuccinimida
Gel	Gelatina
Hep	Heparina
PLL	Poli-L-lisina
Chi	Quitano
KeV	Kilo electronvoltio
FTIR	Espectro de infrarrojos por transformada de Fourier
TGA	Análisis termogravimétrico
DMSO	dimetilsulfóxido
P/S	Penicilina/estreptomicina
FBS	Suero fetal bobino
ETOH	Etanol

## 1. MOTIVACIÓN

La principal motivación para realizar un Trabajo Final de Máster (TFM) en el área de la ingeniería tisular es debido a mi interés en mejorar la vida de las personas. Este interés quedó demostrado a lo largo del grado en ingeniería biomédica y el Trabajo Final de Grado realizados, también relacionados con la ingeniería tisular. Con el máster de ingeniería biomédica y el presente TFM, lo que buscaba era complementar y profundizar en las ramas más biológicas del campo y formarme para poder contribuir en un futuro a mejorar el mundo. Después de la pandemia vivida, creo que dedicar mis esfuerzos al avance de la sociedad y la salud de todos los ciudadanos es una de las tareas más honorables.

La motivación para continuar mi formación práctica en el CBIT fue la experiencia vivida y la calidad de todos los que integran el centro, más que de asignaturas del máster o grado. De hecho, me motiva tanto el proyecto que presento en este documento, que voy a seguir trabajando en ello durante los siguientes tres años mediante una beca de doctorado.

Pese a los problemas que han ido surgiendo durante el desarrollo del trabajo y la frustración que eso ha conllevado, no puedo más que reafirmar mi voluntad de trabajar en la investigación el máximo tiempo que me sea posible. La satisfacción que se siente al ver que los esfuerzos y sacrificios realizados permiten obtener resultados es algo indescriptible. Es por esto mismo por lo que sigo creyendo que el trabajo en ciencia requiere de una parte vocacional, de ser proactivo y de ser capaz de gestionar los resultados negativos o el fallo de los experimentos.

Este proyecto estaría englobado en la investigación básica, por lo que, probablemente tarde mucho en llegar a ser aplicado en la clínica. Sin embargo, pensar en poder contribuir a mejorar, aunque sea mínimamente el tratamiento en personas con cáncer de mieloma múltiple, es el mejor de los impulsos para dar el máximo por este proyecto.

Académicamente, este trabajo me permite desarrollar habilidades en los campos de conocimiento de:

- Investigación sobre la literatura científica.
- Fabricación de microesferas poliméricas.
- Funcionalización de biomateriales.
- Caracterización de biomateriales.
- Microfluídica.
- Impresión 3D polimérica.
- Cultivo de células de mieloma múltiple.
- Síntesis de microgeles.
- Estudio de viabilidad celular.



## 2. OBJETIVOS

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, así como una de las patologías más comunes a nivel global. Si bien es cierto que cada vez más tumores malignos son curables, existen otros que no. El mieloma múltiple es una enfermedad neoplásica de las células plasmáticas sanguíneas que actualmente no posee cura. Además, es un tumor sujeto a una gran variabilidad, por lo que las características de las células de cada paciente son diferentes. Por esta razón, es necesario un estudio previo del tumor en cada paciente, con la intención de encontrar el tratamiento más efectivo para cada individuo.

Para la búsqueda de la personalización del tratamiento y la investigación de nuevos fármacos, nace este novedoso modelo de enfermedad. La plataforma estará basada en un microgel que consistirá en una suspensión de microesferas y células de mieloma múltiple. Las microesferas poseerán una funcionalización en su superficie que, a su vez, permitirá licuar el interior formando las microcápsulas huecas. La funcionalización se realizará con biomateriales presentes en la médula ósea para ofrecer un entorno de cultivo biomimético, en el que las células tumorales recreen fielmente su comportamiento *in vivo*. El cultivo celular se realizará en tubos eppendorf que estarán en constante movimiento, recreando el entorno natural de crecimiento del mieloma múltiple.

Por lo tanto, el principal objetivo del presente TFM ha sido la síntesis y validación de la plataforma de cultivo en tubos eppendorf basada en microgeles. Para lograrlo, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo 1.** Puesta a punto de la fabricación de las microesferas poliméricas.

**Objetivo 2.** Funcionalización de la superficie de las microesferas por deposición por capas de polielectrolitos de cargas opuestas (LBL) y presentes en la médula ósea.

**Objetivo 2.1.** Selección de los pares de polielectrolitos.

**Objetivo 2.2.** Adaptación de protocolos de LBL a las microesferas empleadas.

**Objetivo 3.** Caracterización de las microesferas obtenidas.

**Objetivo 3.1.** Caracterización morfológica de las microesferas con y sin funcionalizar.

**Objetivo 3.2.** Caracterización bioquímica de las microesferas con y sin funcionalizar.

**Objetivo 4.** Validación de la plataforma de cultivo propuesta.

**Objetivo 4.1.** Adaptar protocolos de cultivo ya existentes para pocillo a un tubo eppendorf de un volumen de 2 mL.

**Objetivo 4.2.** Realizar un cultivo a 5 días en el que probar la viabilidad del cultivo celular con los microgeles.

Para ilustrar mejor la plataforma de cultivo desarrollada en este trabajo, se puede observar en la Figura 1 una representación del concepto:

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

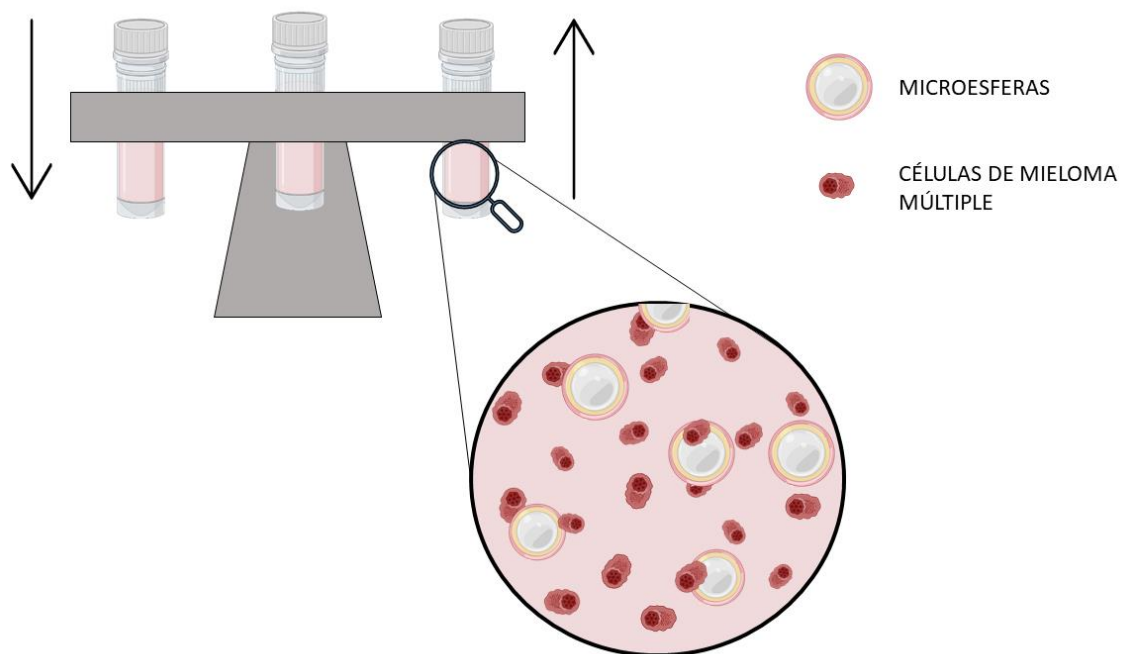


Figura 1. Esquema de la plataforma de cultivo propuesta. Realizado por la autora con PowerPoint

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de la sangre caracterizada por la acumulación de anticuerpos monoclonales en la médula ósea. Las células sanguíneas que mutan en este tumor son las células plasmáticas (PCs) que son fruto de la maduración de los linfocitos B y cuya función es la producción de anticuerpos para proteger al cuerpo frente a agresiones externas (Figura 2). Tanto los linfocitos B como las células plasmáticas forman parte del sistema inmune y provienen de las células madre hematopoyéticas (HSCs) (Clara-Trujillo et al., 2020).

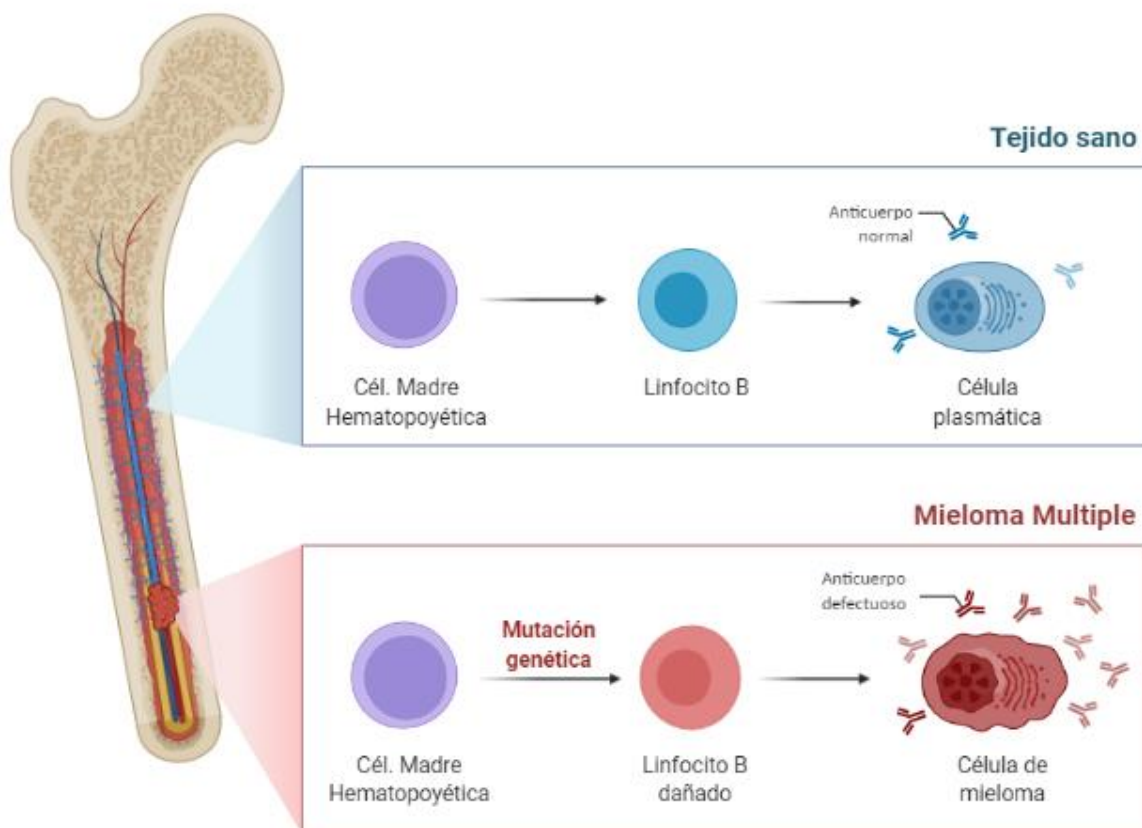


Figura 2. Esquema comparativo entre tejido sano y mieloma múltiple. Realizado por la autora empleando Biorender

Este tumor neoplásico se caracteriza por una proliferación descontrolada de las PCs debido a mutaciones en los linfocitos B. Esta proliferación excesiva produce en ocasiones que las PCs mutadas invadan y destruyan los huesos adyacentes o que se infiltren en la sangre y proliferen en otro órgano (metástasis). Además, a la vez que proliferan y consumen los recursos y el espacio del resto en la médula ósea, producen anticuerpos monoclonales M (o proteínas M) que son defectuosos y que también se acumulan en la médula (Equipo de la asociación americana contra el cancer, 2018; Kyle & Rajkumar, 2009) (Figura 2). Esto se refleja a nivel macroscópico con una sintomatología grave que incluye desde fracturas óseas vertebrales y anemia hasta fallos renales e inmunodeficiencia (Alvarado-Ibarra et al., 2015; Podar et al., 2009).

Las mutaciones que inducen a la tumorigénesis en los linfocitos B, que deriva en el MM, aún no se conocen en su totalidad. No obstante, sí ha sido demostrado que, en un porcentaje de los pacientes, están presentes mutaciones en el brazo largo del cromosoma 14 (contributors &

Firth, 2019; Pasca et al., 2019). Estas mutaciones son generalmente translocaciones de un solo nucleótido, que afectan principalmente a los genes KRAS, NRAS y, con menor frecuencia, BRAF. Estas, aunque no parecen capaces de desencadenar por ellas mismas toda la enfermedad, se asocian a la gran variedad de mutaciones por paciente que caracteriza al MM (Pasca et al., 2019). Otro dato avalado por la comunidad médica y científica es que, en la mayoría de los casos, el MM es precedido por la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) (Agarwal & Ghobrial, 2013; Equipo de la asociación americana contra el cancer, 2018; Manier et al., 2012).

Las enfermedades previas al MM, como el MGUS, son más complejas de diagnosticar puesto que la sintomatología es menor, más leve o no la poseen (se llaman enfermedades asintomáticas) (Agarwal & Ghobrial, 2013). Para detectar la patología de MM se puede partir de un paciente con alguna de las enfermedades precursoras de esta (como el MGUS) o de pacientes nuevos. En ambos casos, son necesarias muchos tipos de pruebas diagnósticas diferentes, pues la sintomatología es compartida por un gran abanico enfermedades. Entre todas estas pruebas diagnósticas, se destaca la revisión de la anemia y lesiones óseas como la osteopenia, la detección de exceso de más del 10% de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea o la detección de proteínas M en la orina o la sangre (Alvarado-Ibarra et al., 2015; Kyle & Rajkumar, 2009)

El impacto epidemiológico de esta neoplasia en la población mundial es relativamente bajo, ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el mieloma múltiple representa el 1% de todas las neoplasias malignas y el 10-15% de las neoplasias hematológicas. Sin embargo, la población que pueda padecer el MM va a incrementarse con el aumento de la edad de la población, ya que es más común en personas mayores de 50 años. El pronóstico para los pacientes que padecen esta enfermedad ha mejorado de 3 años en la década de 1970 a 7 años en la actualidad (Alvarado-Ibarra et al., 2015). Esta mejora en la esperanza de vida y en la calidad se debe al amplio espectro de tratamientos disponibles para los pacientes que sufren de MM. Los medicamentos administrados dependerán de la salud del paciente, del estadio de la enfermedad y de la susceptibilidad al trasplante de médula ósea. Con frecuencia, se usa una combinación de varios medicamentos, puesto que cada uno ataca a las células tumorales de una forma diferente. Entre los más frecuentes están el Bortezomib, que inhibe el proteasoma, la Lenalidomida, que es un inmunomodulador y la Dexametasona, que es quimioterapéutica. No obstante, debido a la supervivencia de clones residuales y resistentes a los fármacos, se produce sucesivas recaídas y el paciente acaba falleciendo (Dingli et al., 2017).

### 3.2. La médula ósea

La médula ósea (BM por sus siglas en inglés) es un tejido blando que se encuentra en el interior de las cavidades centrales de los huesos largos y en las trabéculas del hueso esponjoso. Es posible dividir la médula ósea en roja o amarilla, en función de si predomina en esa zona el tejido y células hematopoyéticas o las adiposas y la grasa. Mientras que la médula ósea amarilla tiene como función principal el almacenaje de grasa y en ella están las células madre mesenquimales, la médula roja tiene como función la producción de todas las células sanguíneas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas). No existe una separación estricta entre ambas zonas, pero fisiológicamente hay zonas donde el porcentaje de adipocitos es mayor y zonas donde hay más líneas hematopoyéticas (*Bone Marrow | Anatomy | Britannica*, n.d.; McLarnon, n.d.; Nombela-Arrieta & Manz, 2017). En la Figura 3 se ilustra la organización de los componentes de la médula ósea comentados (Méndez-Ferrer et al., 2020).

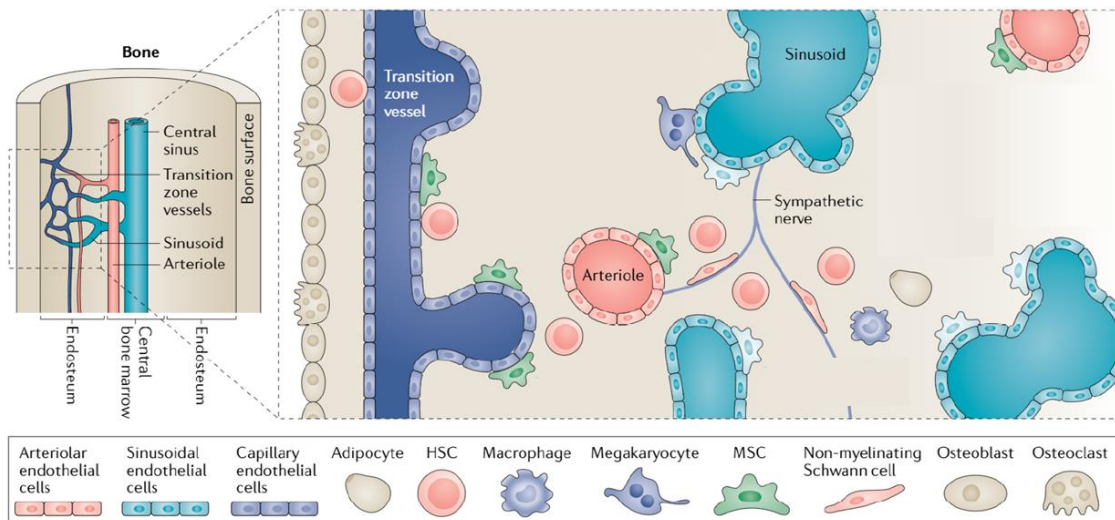


Figura 3. Esquema del microentorno de la médula ósea. Vía Méndez-Ferrer et al. 2020. (Méndez-Ferrer et al., 2020)

A nivel celular, las células hematopoyéticas están en un entorno de hipoxia y en el cual interactúan con las otras células (células madre mesenquimales (MSCs), osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) y sus proteínas de membrana (glucocálix), factores solubles y con la matriz extracelular (ECM). Esto se conoce como microentorno o nicho, y la forma en la que interactúan las células hematopoyéticas con él es lo que va a condicionar la diferenciación replicación y función hematopoyética (Klamer & Voermans, 2014; Lazar-Karsten et al., 2011; Manier et al., 2012). Las biomoléculas más importantes del microentorno, y las que más funciones reconocidas poseen son la fibronectina (FN), el colágeno tipo I y XI, la laminina o la elastina y las glicoproteínas más presentes en el microentorno son el ácido hialurónico (HA), el condroitín sulfato, el heparán sulfato y la heparina (Klamer & Voermans, 2014).

Al igual que el microentorno influye en las células hematopoyéticas sanas, también lo hace con las células de mieloma múltiple. De hecho, una vertiente de la investigación sobre el MM busca descifrar esa relación del entorno con las células de mieloma múltiple (MMCs) y con ello, buscar nuevos tratamientos. De entre toda la literatura, se destacan los trabajos de Carlos Marín, Hu y Polyhak y Méndez-Ferrer et al. por su relación con la hipótesis del presente trabajo. En ellos, los autores concluyen que esos componentes de la BM influyen de manera directa (célula-célula, célula-matriz) o indirecta (mediante factores solubles) en la resistencia a fármacos y en la proliferación y supervivencia del tumor (Hu & Polyak, 2008; Manier et al., 2012; Marín-Payá, 2020; Méndez-Ferrer et al., 2020; Vincent & Mehti, 2005):

- **MSCs:** Estas células y las MMCs se relacionan mediante adhesiones célula-célula (intervención directa) y mediante los elementos que las MSCs secretan al nicho (forma indirecta). Una de las mutaciones más estudiadas de estas células es la de los genes que las hacen expresar reclamos para monocitos inflamatorios. Estos incrementan el estado inflamatorio secretando citoquinas IL-1 $\beta$ . Este estado de inflamación favorece la progresión del MM. Otra forma muy estudiada en la que las MSCs favorecen el MM es mediante sus interacciones directas con estas células. Cuando las células tumorales entran en contacto con estas células, se desencadena la vía de señalización NF-kB y la secreción de interleuquina-6 (IL-6) en las MSCs. Esta IL-6 aumenta la producción y secreción de VEGF por parte de las MSCs y favorece la angiogénesis (que nutrirán a las MMCs). También las MSCs junto con los osteoblastos secretan factores de crecimiento de la insulina (IGF-1) que está ampliamente relacionado con la oncogénesis. Este factor

es captado por las MMCs y les permite activar proteínas antiapoptóticas, promoviendo su supervivencia.

- **Colágeno:** Esta proteína de triple cadena con forma de hélice es la más común de todo el cuerpo humano. Su interacción con las MMCs es directa, y está intermediada por Síndecan-1, que se conoce que juega un papel importante como intermediario en las interacciones célula-ECM de las MMCs. También está relacionado con rutas metabólicas que activan señales asociadas a la proliferación y diseminación de las MMC.
- **HA:** Este glucosaminoglicano (GAG) es el mayor componente de la ECM. Es capaz de interactuar con las MMCs de forma directa e indirecta, puesto que puede retener o presentar a las MMCs factores solubles como las citoquinas o unirse a las propias MMC. Para unirse a las MMC, estas emplean la molécula de adhesión CD44. La unión entre el HA y las MMCs se ha demostrado que afecta a resistencias a fármacos como la Lenalidomida porque esta unión permite la activación de una ruta metabólica relacionada con la IL-6 que favorece la proliferación.
- **Heparina:** Este GAG está presente en las superficies celulares (glucocálix) y en la ECM. En este caso, está formado por una repetición de los disacáridos D-glucosamina y D-ácido glucurónico muy sulfatados. Esta estructura les permite interactuar con un gran abanico de factores solubles, entre los que destacan factores de crecimiento o interleuquinas. Esta capacidad le confiere la habilidad de modular gran cantidad de rutas metabólicas en cualquier tipo celular, y decantarlas hacia cualquier destino.

### 3.3. Modelos actuales para el cultivo celular

Desde usarlos para conocer a fondo los mecanismos celulares, hasta emplearlos para probar la eficacia de diferentes medicamentos, los cultivos celulares se han vuelto una pieza clave en el mundo biomédico. En los últimos tiempos se están desarrollando nuevas formas y plataformas de cultivo para los distintos tipos celulares, con la esperanza de mimetizar mejor el entorno *in vivo* en el que están y con ello, obtener resultados *in vivo* parecidos a los *in vitro*.

Cada tipo celular o enfermedad tiene un microentorno que la rodea, o requiere de unas características específicas. Es por esta razón, por la que existen cientos de modelos de cultivo diferente. Para generar un nuevo modelo de cultivo, se debe tener en cuenta que se ha de elegir entre muchas opciones antes de probarlo. Entre todas estas opciones se destacan:

En primer lugar, el tipo de células empleadas. La procedencia de estas puede ser una casa comercial, o pueden provenir de pacientes reales. Cada tipo de célula posee ventajas y desventajas, como que las de casa comercial se compran y puedes tener mucha cantidad, pero no van a representar toda la casuística que existe. Por otro lado, las de paciente sí van a ofrecer todos los fenotipos y genotipos, pero su problema es que se obtienen de una biopsia y generalmente se extraen pocas de cada paciente. Además, a las células de paciente les cuesta proliferar *in vitro* inicialmente (Zlei et al., 2007). El estado de desarrollo y la naturaleza de la investigación serán los que determinen qué tipo de células se van a emplear.

En segundo lugar, existen modelos de cultivo simple o de co-cultivo. La diferencia reside en la presencia de un único tipo de células, o en si hay varios tipos celulares diferentes. Esta decisión dependerá de lo que se busque descubrir con el ensayo.



En tercer lugar, se puede generar un modelo de cultivo teniendo en cuenta cómo va a ser el soporte en el que se va a realizar. En función del tipo celular, interesa más un cultivo de las células en 2D o 3D. De igual forma, una vez elegida la dimensionalidad, se pueden añadir muchas otras cosas al modelo, como materiales (esferas, láminas, hidrogeles, filamentos...), estímulos (mecánico, eléctrico, magnético...), factores solubles (factores de diferenciación, medio de cultivo sencillo, fármacos...) o forma del cultivo (adherido, en suspensión...).

Por tanto, como todas estas elecciones deberán basarse en lo que se busque explorar con el cultivo, así como en la capacidad de cada plataforma de simular mejor el entorno *in vivo* (biomimetización), en cada patología y equipo de investigación se optan por unas cosas u otras. Schüler et al. (Schüler et al., 2013) exploran bastantes modelos de cultivos de MM empleados hasta la fecha, entre los que destacan el cultivo en 2D de un solo tipo celular, el co-cultivo en 2D y el co-cultivo en 3D.

Los dos cultivos en 2D estudiados son en medio líquido y el principal problema es que, si bien han sido de gran utilidad para el desarrollo de fármacos, la falta del microentorno ha perjudicado los resultados obtenidos. Los cultivos de MMCs por ellas mismas, además tienen el problema añadido de que no proliferan las MMCs si no les añades citocinas de forma artificial (Schüler et al., 2013). El co-cultivo permite que las MMCs tengan una parte de ese microentorno de la BM necesario para que el comportamiento *in vitro* sea equivalente al que habrá *in vivo* (Clara-Trujillo et al., 2020).

Los cultivos en 3D o semisólidos para MM pueden emplearse en cultivo simple o en co-cultivo. En ellos no se añaden solo células, sino que se añaden también componentes de la ECM para mimetizar mejor el entorno. La forma en la que se pueden añadir es variable (*scaffolds* (andamiajes en inglés) semirrígidos, microesferas, cápsulas...) por lo que es difícil comparar entre las diferentes plataformas. Además, por poseer más componentes y ser más complejos son más costosos. No obstante, los resultados que se obtienen son más similares a los *in vivo* que en 2D. De hecho, varios estudios confirman que el co-cultivo en 3D con y sin materiales de la ECM ofrecen mejores resultados que el mismo co-cultivo en 2D. Y esto se debe a que, como se ha expuesto previamente, el microentorno tiene un efecto evidente sobre el desarrollo del MM, aunque aún se está trabajando por descubrir cuál es el efecto de cada componente (Clara-Trujillo et al., 2020; Schüler et al., 2013).

### 3.4. Microgeles

Se llama microgel al aglomerado en medio acuoso de partículas micrométricas. Frecuentemente los microgeles son esferas poliméricas reticuladas, capaces de contener líquidos y otras sustancias en su interior y con una biocompatibilidad y propiedades muy interesantes (Caldwell et al., 2020; Newsom et al., 2019). Entre esas propiedades, se destacan capacidad de simular la ECM de tejidos líquido-viscosos o fabricarse a partir de sus componentes. También se destacan las propiedades mecánicas, que pueden llegar a ser similares a los tejidos blandos del cuerpo y la habilidad de intercambiar sustancias con el medio. Además, igual que los hidrogeles, los materiales que generan las microesferas pueden entrecruzarse de formas reversibles (enlaces iónicos o interacciones físicas) e irreversibles (enlaces covalentes) (Caldwell et al., 2020; Newsom et al., 2019).

En función del tamaño de micropartícula, especificidad del diseño, y la disposición utilizada, estos pueden emplearse de muchas formas diferentes en el campo de la ingeniería tisular

(Figura 4). Por ejemplo, si empleamos las subunidades del microgel por separado y de forma individual, podemos realizar diferentes estrategias, entre las que se destacan el uso para sembrar células adherentes en su superficie y luego transportarlas a otros espacios de cultivo o usarlos como biorreactores en los que encapsular células. Micropartículas más pequeñas, por otro lado, pueden emplearse como transportadores de sustancias en el cuerpo humano y en cultivo o como presentadores de materiales para las células en cultivos sólidos o de suspensión. Finalmente, para los microgeles cuyas subunidades se empleen de forma conjunta, pueden formar *scaffolds* por su cuenta o junto a otros materiales y microgeles de muchas formas (Caldwell et al., 2020; Newsom et al., 2019).

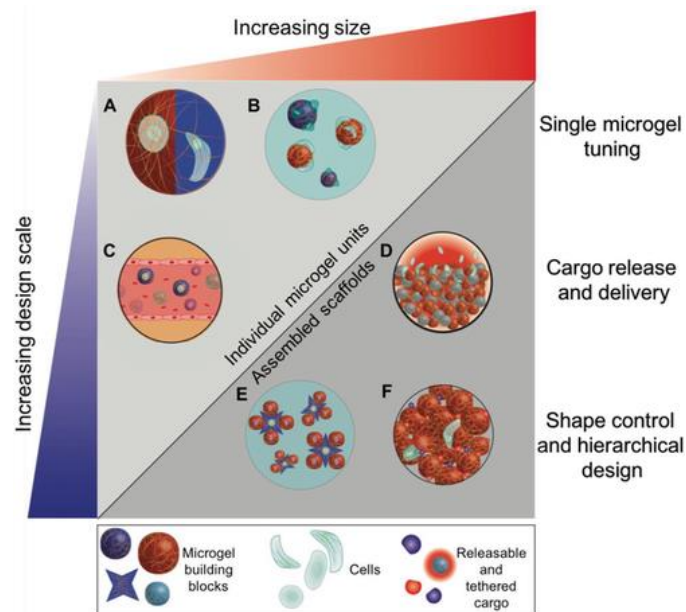


Figura 4. Aplicaciones de los microgeles en función de la organización: A) la encapsulación 3D, B) la expansión celular, C) transporte de sustancias in vivo, D) Scaffolds simples ensamblados, F) Scaffolds de mayor orden ensamblados y E) Formas de tipo "cerradura y llave". Vía Caldwell et al. 2020 (Caldwell et al., 2020).

Otro de los puntos clave de los microgeles, es la versatilidad que existe para lograr su fabricación y las posibles formas que puede adquirir este según el método de obtención empleado. Las técnicas más comunes para producir las micropartículas son la emulsión, el secado por aspersión, la microfluídica y la coacervación. Cada forma de producción de micropartículas para los microgeles ofrece unas propiedades específicas, como el tamaño de partícula; por lo que, según lo que interese en cada trabajo, la técnica empleada será una u otra. Por otro lado, las morfologías más comunes en los microgeles son la esférica y la coloidal, pero pueden llegarse a obtener hilos (Caldwell et al., 2020).

### 3.4.1. Microfluídica

La técnica más versátil tanto para los rangos como para la forma es la microfluídica. Esta técnica basa la fabricación de las micropartículas en el uso y diseño de canales y el manejo de flujos de diferentes soluciones inmiscibles. Los sistemas de microfluídica permiten la obtención directa y monodispersa de materiales de una o varias fases y de un tamaño u otro atendiendo a propiedades como la cantidad de canales, el recorrido del constructo por el sistema o la forma de obtener las microgotas (cada unidad del microgel). En los materiales con una sola fase, la forma de obtener las microgotas va a estar determinada, por el lugar en el que se unen el medio continuo y el discontinuo en el sistema, que deben ser inmiscibles. De hecho, según la interfaz



de unión que exista se tienen sistemas conocidos por su denominación en inglés *t-junction*, *flow-focussing* o *co-flowing* (Choe et al., 2018):

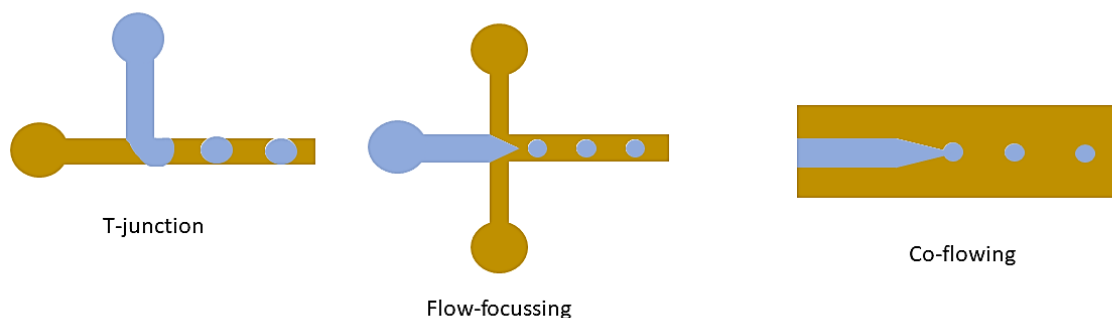


Figura 5. Principales formas de obtención de droplets por microfluídica. Realizado por la autora empleando PowerPoint

En la formación de las microgotas en el circuito juega un papel esencial la tensión superficial de los dos fluidos: el medio continuo y el discontinuo (el que forma la gota). Este papel se basa en la inmiscibilidad de ambos medios, como ocurre en una emulsión de un medio acuoso en un medio oleoso o viceversa. De la misma forma, el material del que se hace el circuito debe tener afinidad por el medio continuo, es decir, un material hidrofílico si el medio continuo es un medio acuoso o un material hidrofóbico si es oleoso. Con esto, si la solución discontinua está basada en agua, como se representa en el esquema de la Figura 5, la superficie de contacto debe ser hidrófoba, para evitar que la microgota se deshaga por contacto. De igual forma; si el medio discontinuo es hidrófobo, la superficie de contacto con el sistema deberá ser hidrófila, para repeler la microgota (Nisisako et al., 2005).

Una vez formada la microgota, es necesario coagularla para formar la micropartícula sólida, el procedimiento depende del material utilizado, y puede realizarse en el propio canal del circuito o posteriormente. Frecuentemente, el medio discontinuo es una disolución polimérica y se coagula mediante un proceso de eliminación del disolvente, bien sea absorbido por el medio discontinuo o por evaporación en un medio externo, otras veces la microgota coagula por acción de un agente entrecruzador (será el procedimiento utilizado en este trabajo) y otras veces la micropartícula se produce por un cambio de temperatura o por una reacción química iniciada por temperatura (Singhal & Gupta, 2016).

Para regular los tamaños, en microfluídica se actúa sobre los flujos de los dos medios existentes. Esto afecta a la fuerza con la que el medio continuo impacta con el discontinuo y la resistencia que este ejerce sobre el primero (Anna et al., 2003).

### 3.5. Materiales para las microesferas

Las microesferas que se van a emplear necesitan ser de un tamaño regulable, estables, y capaces de ser funcionalizadas con distintos materiales de la BM. Además, sus componentes deben ser biocompatibles.

### 3.5.1. Material de soporte

La microesfera que se va a emplear como base del modelo de enfermedad va a ser de alginato o alg.

El alginato es un biopolímero extensamente utilizado en la ingeniería tisular debido a sus propiedades y características. Entre estas cualidades se destacan una baja toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, posee una química que hace que casi no interactúe con las células humanas porque estas no poseen receptores para interactuar con el alginato si este es ultrapuro (Andersen et al., 2015). Otra razón es que, debido a que es el segundo biopolímero más abundante (tras la celulosa) y su producción no es muy costosa, el precio que alcanza es relativamente bajo. También posee excelentes cualidades como hidrogel con enlaces iónicos (por lo que se puede deshacer también fácilmente) y gelifica a temperaturas de menos de 100°C (Sahoo & Biswal, 2021).

Enfocándolo en la química del alginato, este es un polisacárido lineal que proviene de distintas algas pardas y que está formado por la unión de 2 monosacáridos de forma no secuencial. Los monosacáridos en cuestión son el  $\beta$ -D-manuronato (M) y  $\alpha$ -L-guluronato (G) que se unen por enlaces glicosídicos 1 $\rightarrow$ 4. Como no son unidades repetitivas y el orden puede cambiar, existen todas las combinaciones de los monómeros que se ven en la Figura 6. Además, como es un polisacárido, su carga a pH neutro es negativa, dato interesante de cara al método de funcionalización (Ayarza, 2014)

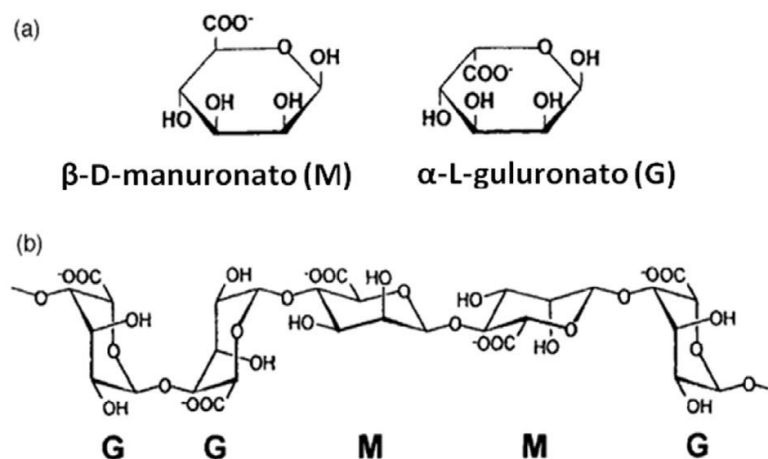


Figura 6. Estructura química del alginato. A) monómeros y B) combinaciones posibles. Vía Ayarza et al. 2014 (Ayarza, 2014)

### 3.5.2. Formas de obtención

La base del microgel empleado van a ser microesferas de alginato, reticuladas empleando enlaces iónicos. Este tipo de gelificación de las microesferas puede ser externa o interna, dependiendo del material empleado para entrecruzar y como interactúa con el alginato. El principal método de gelificación externa está basado en el baño de las micropartículas de alginato en cloruro de calcio a bajo pH. El cloruro de calcio se disocia y el calcio va penetrando en el cuerpo de la microesfera a la vez que la entrecruza. Por otro lado, en la reticulación interna, el principal método está basado en el carbonato cálcico. En este caso, la solución de alginato contiene carbonato cálcico dispersado. Se forman las partículas con cualquiera de los métodos que se conocen y se entrecruzan al sumergirse en un baño de pH ácido que provoca la

disociación del carbonato cálcico en el interior de la microesfera (Hernández-González et al., 2019). En este trabajo se va a seleccionar el segundo por ser más homogénea la reticulación, el enlace iónico en el que se basan ambos es el del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a la cadena de alginato como se muestra en la Figura 7.

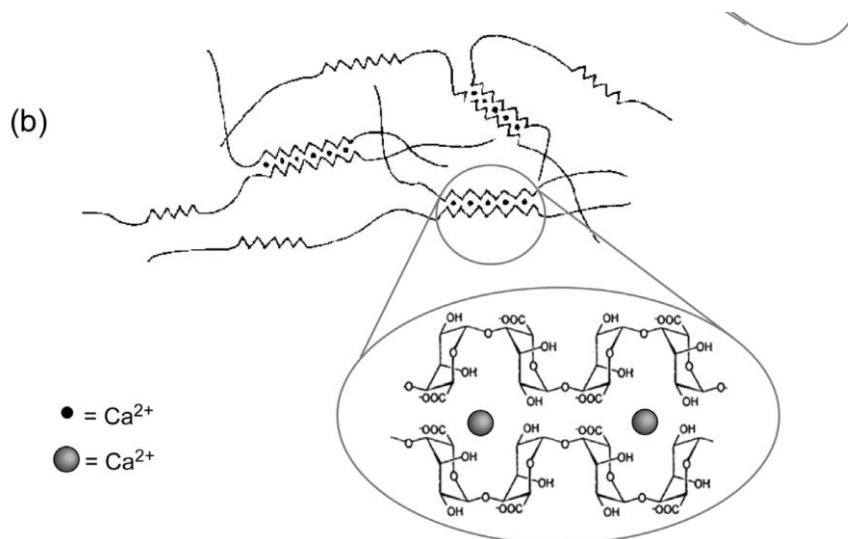


Figura 7. Enlace iónico por calcio de las cadenas de alginato, dando lugar a la gelificación del material. Vía Ayarza et al. 2014

Las esferas se van a obtener empleando un sistema de microfluídica basado en el *Flow-focusing* en el que alginato irá disuelto en agua con carbonato cálcico (gelificación interna) y el medio continuo será aceite. Para lograr la reticulación mediante el ion calcio será necesario bajar el pH de las microesferas para disociar el ion calcio del carbonato cálcico y que al estar dentro de la microesfera las una formando el gel (Figura 7).

### 3.5.3. Funcionalización de las microesferas

Existen muchas técnicas para la funcionalización de superficies, que dependen del material a funcionalizar. Dado que nuestros materiales son biopolímeros, las posibilidades para la funcionalización se ven reducidas respecto a los materiales sintéticos. La base para la modificación de la superficie puede estar basada en métodos físicos o químicos. Entre los métodos químicos destacan el tratamiento de plasma o el injerto de las cadenas de la biomolécula sobre la superficie mediante enlaces covalentes; y entre los métodos físicos destacan la absorción de moléculas por parte del material o la deposición de diferentes polielectrolitos de cargas opuestas formando capas de recubrimiento. Este último es el que se va a emplear en el trabajo porque ofrece un gran abanico de funcionalidades puesto que todas las biomoléculas de interés tienen algún tipo de carga positiva o negativa (Rana et al., 2016).

Por tanto, centrándose en la técnica empleada, esta puede llamarse deposición de polielectrolitos o *Layer by Layer* por su nombre en inglés (LBL). Esta técnica está basada en las interacciones electrostáticas, entre capas de diferentes cargas (Rana et al., 2016). La forma de obtener las capas del recubrimiento es sumergir el material alternativamente en soluciones acuosas de los dos polielectrolitos que se buscan emplear, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 8. Se necesita un lavado intermedio para eliminar cualquier ion que no esté anclado

en la superficie y que reaccionaría con la disolución de carga opuesta inactivándola en parte o generando precipitados no deseados.

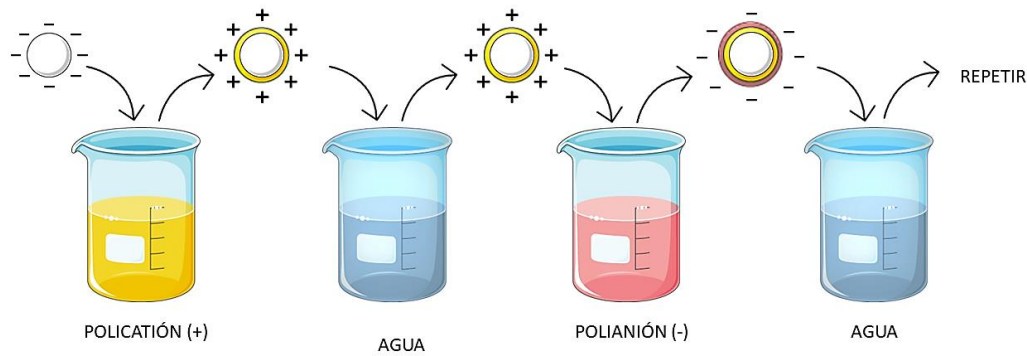


Figura 8. Esquema generalista del proceso de LBL. Realizado por la autora empleando imágenes de Servier Medical Art

Este procedimiento requiere un paso extra para asegurarse de que las capas no se van despegando poco a poco. Este paso sería un entrecruzamiento químico entre las diferentes capas y materiales o entre capas del mismo material que retuviera al otro. Existen muchos tipos de agentes de encruzamiento químico pero los más comunes son el glutaraldehído, el genipín y el par 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocioruro o EDC/ N-hidroxisuccinimida o NHS.

Los materiales escogidos son los pares gelatina-alginato, quitosano-heparina y poli-L-lisina-alginato. Se busca que la heparina y la gelatina queden en la última capa para que se puedan mostrar a las células de mieloma múltiple y observar su efecto. Se emplean estos dos materiales por su presencia en la BM y porque cada una representa un tipo de interacción de la MMC con el entorno. Por otro lado, la poli-L-Lisina (PLL) se emplea en busca de la estabilización de la microesfera.

### Gelatina (Gel)

La gelatina es una proteína natural que surge de la hidrólisis de triple hélice alfa del colágeno. Los colágenos presentan pequeñas diferencias entre especies por lo que pueden emplearse colágenos de origen animal en muchas aplicaciones en humanos. Las gelatinas son biocompatibles y biodegradables y se emplean actualmente en distintas terapias de suministro controlado de fármacos o en ingeniería tisular. Además, su estructura química (Figura 9) posee tanto grupos carboxilo como amina, que la hacen susceptible de reaccionar con otras sustancias, o poseer diferentes cargas electrostáticas en función del pH (Reyes-Ortega et al., 2012).

La gelatina presenta secuencias de los péptidos de adhesión celular arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Esta secuencia de adhesión está también presente en el colágeno presente en el entorno natural de la BM. Se plantea la hipótesis de que la adhesión de las MMCs al colágeno o la gelatina a través de esta secuencia de adhesión induzca rutas de generación de resistencia a fármacos (interacción directa). Es interesante que la secuencia RGD es más accesible para las células que en el colágeno. Esta es la razón por la que se use gelatina y no colágeno en este trabajo (Ruoslahti, 1996).

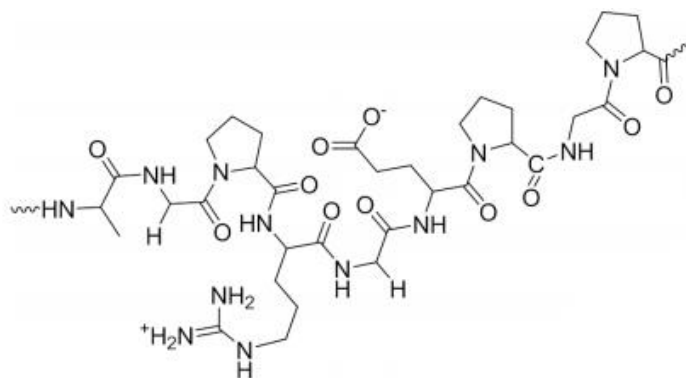


Figura 9. Estructura química de la gelatina. Vía Reye-Ortega et al. (Reyes-Ortega et al., 2012)

### Heparina (Hep)

La heparina, que representa la interacción indirecta entre las MMCs y el entorno, es un GAG que como se ha comentado previamente, está presente en el glucocáliz de todas las células. Es una molécula basada en los glúcidos pero que también contiene grupos amino y que además está sulfatada. La estructura química que posee (Figura 10) hace que su carga pueda variar entre positiva o negativa en función del pH, aunque en este trabajo se va a emplear como polianión. Además, posee propiedades muy interesantes en clínica como la inhibición de la coagulación sanguínea. No obstante, su interés en el estudio del MM reside en la capacidad de mostrar o no los diferentes factores solubles a las MMCs, como se ha comentado previamente en esta introducción.

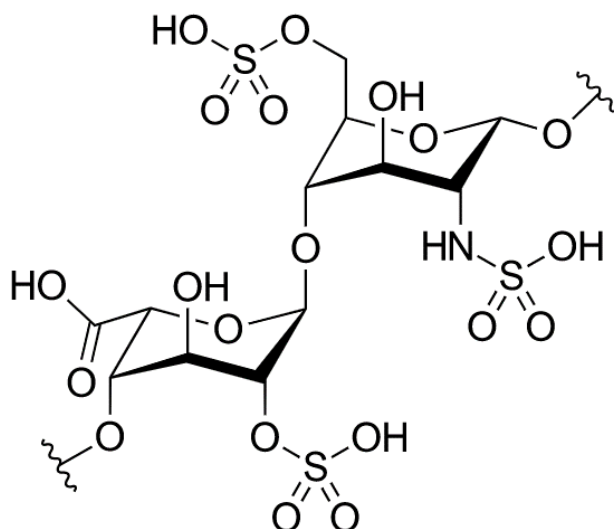


Figura 10. Estructura química de la heparina. Vía Wikipedia (Wikipedia community, n.d.)

### Quitosano (chi)

El quitosano es un polisacárido lineal nitrogenado obtenido a partir de la desacetilación de la quitina. La quitina es el principal componente del exoesqueleto de los insectos y de los caparazones de crustáceos (Vargas et al., n.d.). Si se observa su estructura química (Figura 11), la presencia de esos grupos nitrogenados, que son los que, al contrario de otros muchos biopolímeros, le confieren una carga positiva a pH neutros y ácidos (Gåserød et al., 1999).

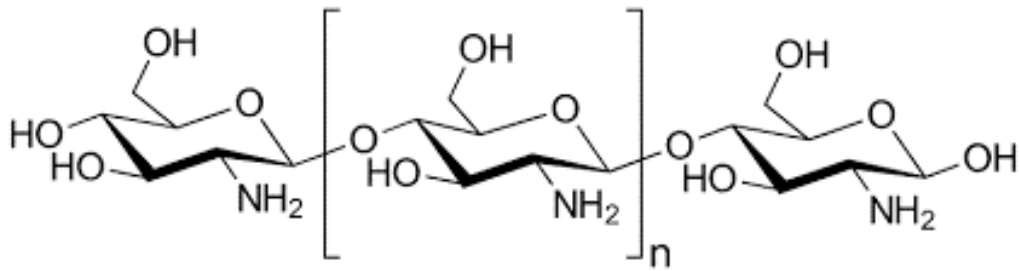


Figura 11. Estructura química del quitosano. Vía Wikipedia (Wikimedia Commons, n.d.)

Este biopolímero siente una fuerte atracción por la carga negativa del alginato, por lo que es perfecto como policación en el LBL. Además, es capaz de penetrar en las microesferas de alginato si se dejan estas sumergidas en una disolución de quitosano el tiempo suficiente (Gåserød et al., 1999).

### Poli-L-lisina (PLL)

La poli-L-lisina (PLL) es el homopolímero L del aminoácido lisina (Figura 12). Aunque es sintético, la L-Lisina sí que está en el cuerpo de los animales de forma natural. Debido a la presencia de un grupo funcional amina en su radical, la carga de la PLL va a ser positiva a pH ácido y neutro. Pese a que tiene propiedades antitumorales o antivirales, su uso en este trabajo es exclusivamente para estabilizar la microesfera de alginato generando las primeras capas del LBL (actúa como catión) (Correia et al., 2013; Ryou et al., 2011).

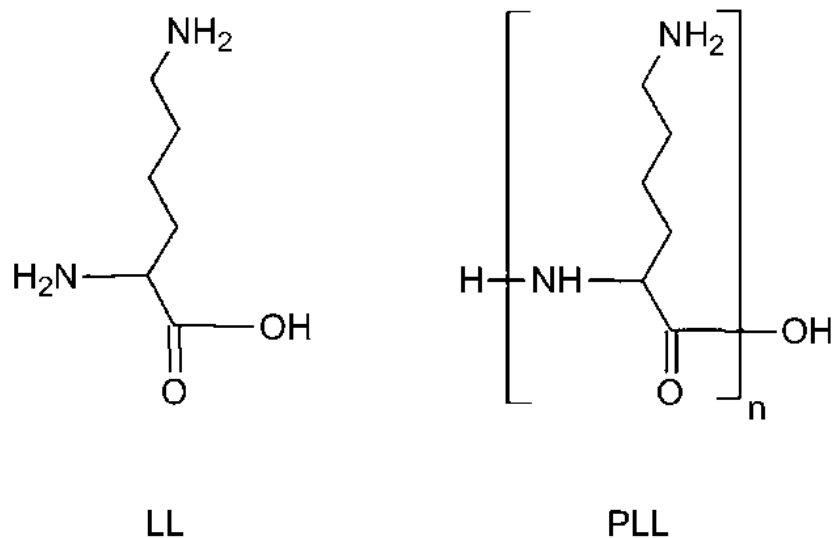


Figura 12. Estructura química de la lisina y la poli-L-lisina. Vía (Ryou et al., 2011)

## 4. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo pretende sentar las bases de una nueva plataforma para generar modelos de enfermedad de mieloma múltiple. Y es que, es necesario replantearse los modelos existentes hasta el momento en MM ya que no todos representan *in vitro* lo que sucede en realidad *in vivo*. Es por esto, y buscando una biomimetización máxima, por lo que se escoge un modelo en suspensión en 3D al que se le añaden elementos de la médula ósea junto con las células.

Otra de las justificaciones para este TFM es que existe un problema para obtener células de la médula ósea de los pacientes (hay muchos elementos en una biopsia de BM y la cantidad de MMCs es muy pequeña). Además, la expansión de las MMCs es complicada *in vitro*. Estas dos situaciones hacen que la aplicación de esta plataforma en tubos eppendorf, donde el volumen es menor en comparación con algunas de las técnicas de cultivo actuales, puede marcar la diferencia en clínica. Esta diferencia se marcará al no necesitar de tantas células del paciente para realizar una prueba, posibilitando probar más combinaciones de fármacos con una única extracción de muestras del paciente, causándole a este menor perjuicio.

Por otro lado, las microesferas que se plantean permiten un recubrimiento por LBL y están hechas de alginato, que casi no interacciona con las células. Esta técnica permite la combinación de diferentes materiales dejando presente en la superficie el material que se desee. Además, este recubrimiento también va a permitir licuar el interior de la microesfera, deshaciendo los entrecruzamientos iónicos. Este licuado generará una microcápsula hueca que se encontrará en suspensión en el cultivo y dañará menos las MMCs si impacta con ellas durante la agitación del cultivo. Por lo tanto, con esta técnica y con estas microcápsulas huecas, se podrían probar todos los elementos de la BM e investigar cómo interactúan con las células de mieloma múltiple y con otras células, cubriendo así todas las posibles interacciones entre las MMCs y la BM que generan la resistencia a fármacos.

## 5. NORMATIVA

Dada la naturaleza del trabajo, se requiere el cumplimiento de la normativa referente a maquinaria industrial, así como la relacionada con la manipulación y almacenamiento de sustancias y residuos biológicos y químicos. Igualmente, también es necesario seguir las indicaciones de diversas notas técnicas de prevención (NTP) del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo:

- LEY 54/2003, de 12 de diciembre, sobre prevención de riesgos laborales. Mejora de las condiciones de trabajo, aumentando la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores. Principios generales de obligaciones y responsabilidades preventivas.
- REAL DECRETO 614/2001, de 8 de junio, sobre disposiciones mínimas para la protección de la salud y seguridad de los trabajadores frente al riesgo eléctrico (BOE nº 148 de 21 de junio).
- REAL DECRETO 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual. (BOE nº 140 12-06-1997).

- REAL DECRETO 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. Disposiciones mínimas.
- REAL DECRETO 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos.
- REAL DECRETO 379/2001, de 6 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos y sus instrucciones técnicas complementarias.
- UNE EN 1127-1:2012: Atmósferas explosivas. Prevención y protección contra la explosión.
- NTP 9: Líquidos inflamables y combustibles. Almacenamiento en recipientes móviles. NTP 55: Túneles de secado de disolventes inflamables control del riesgo de explosión.
- REAL DECRETO 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, básica de residuos tóxicos y peligrosos.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (BOE 124, 24 de mayo de 1997, págs. 16100-16115).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Para la síntesis de microesferas de alginato se utiliza alginato de sodio de alga marrón de Sigma-Aldrich, carbonato cálcico de Scharlab, aceite de oliva virgen extra comercial (La masía), lecitina de soja de Levantina y ácido acético de Scharlab. Para limpiar y almacenar las microesferas empleamos agua destilada y miliQ, que se obtienen de la grifería del laboratorio y del equipo Direct-Q 3 System Millipore respectivamente y cloroformo de Scharlab.

Para funcionalizar las microesferas se emplea, además del alginato y el ácido acético comentados previamente, gelatina porcina (gelatin from porcine skin, gel strength 300, Tipo A) y glicina de Sigma-Aldrich, glutaraldehído al 25% de Scharlab. También se emplean quitosano y heparina (heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa), cloruro sódico (NaCl, Scharlab), poli-L-lisina, N-hidroxisuccinimida (NHS – 98 %) y N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC) todos de Sigma-Aldrich. Para ajustar el pH de las disoluciones del *Layer by Layer* se emplea ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) de Scharlab.

Para la caracterización de las microesferas se emplean el kit B1000 Blyscan (Bicolor) y el kit de análisis proteico de BCA (ThermoFisher). Además, también se emplean acetato de litio dihidrato, ninhidrina e hidrindantina de Sigma-Aldrich, y etilenglicol y ácido acético de Scharlab para realizar el ensayo de ninhidrina. Todas las lecturas de las absorbancias de estos ensayos se analizan empleando placas p96 transparentes (VWR) y las muestras se preparan en tubos eppendorf de 2 o 1,5 mL.



En la parte del cultivo celular se requieren diferentes reactivos y compuestos, tanto para el acondicionamiento de las microesferas como para el cultivo. Se emplean disoluciones de etanol 70% obtenido con etanol 98% (Scharlab) y agua miliQ y suero salino obtenido con agua miliQ y NaCl (Scharlab), las dos enriquecidas con cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) de Scharlab. Además, es necesario añadirle al medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suero fetal bobino fetal (FBS, Fisher), penicilina-estreptomicina (P/S) (Fisher) y L-glutamina (Lonza). Para expandir las células se emplean flascones de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25), y para el cultivo con microesferas, se emplean criotubos de 2 mL y tapón de rosca (ThermoFisher).

Para la evaluación de la proliferación celular del cultivo se realiza un ensayo PicoGreen. Para la preparación, se congelan la muestra y el criotubo por separado, trasladando la suspensión a otro tubo eppendorf, de 1,5 mL con rosca. Para conocer el contenido de ADN en las muestras, se preparan disoluciones empleando  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Gibco),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  de Pancreac, EDTA, hidrocloreuro de l-cisteína hidratado y solución de stock de papaína (ambas de Sigma). Finalmente se necesita un kit Quant-iT™ PicoGreen® de Invitrogen para completar el protocolo de PicoGreen. Este kit contiene una disolución 20x del tampón TE (basado en tris y EDTA, ya preparado) y una disolución de 100 µg ADN. Las placas de lectura de la señal del PicoGreen son placas de 96 pocillos (p96) negras (VWR).

## 6.2. Preparación microesferas de alginato

Las microesferas de alginato producidas para este trabajo se obtienen mediante microfluídica. Estos sistemas de microfluídica se han fabricado en las instalaciones del CBIT por parte de Luís Amaro Ribeiro Martins. La obtención de microesferas de alginato, entonces, puede dividirse en dos partes:

### **Preparación de las disoluciones**

El sistema de microfluídica va a necesitar de un medio continuo (basado en aceite) y un medio discontinuo (la disolución acuosa de alginato con carbonato cálcico). La combinación del carbonato cálcico con el medio continuo en dispersión permite la gelificación interna de las microesferas mediante el proceso explicado en el apartado de antecedentes. Por lo tanto, se necesita también un medio de bajo pH en el que sumergir las microesferas una vez sintetizadas, que se llamará medio colector:

#### Medio discontinuo:

Se prepara en 3 fases, empleando agitación magnética y frascos Pyrex de 40 mL. Las masas que han de pesarse se hacen empleando una balanza de precisión con pantalla de la marca Mettler Toledo, modelo XS104.

- Fase 1: Solución de alginato al 2% p/v en agua miliQ. Para disolver el alginato en el agua miliQ debe dejarse en agitación magnética durante 1 h a 60°C aproximadamente
- Fase 2: Solución de carbonato cálcico 0,5 M en agua miliQ. Puesto que el carbonato cálcico no es soluble en agua, es necesario generar una dispersión homogénea. Para obtener la dispersión, se sumerge la mezcla de agua y carbonato cálcico en un baño de ultrasonidos por al menos 30 minutos.

- Fase 3: Se mezcla la disolución de alginato con la suspensión de carbonato cálcico, en proporciones iguales 50/50, obteniendo así el medio discontinuo de alginato al 1% y carbonato cálcico 0,25 M.

Medio continuo:

Se obtiene pesando todos los materiales en la Balanza de precisión Entris 2202i-1S SARTORIUS y se almacena en un frasco Pyrex de 250 mL.

- Se añade 1 g de lecitina de soja por cada 100 g de aceite de oliva.
- Se homogeneiza con el agitador magnético hasta disolver la lecitina de soja en el aceite.

Medio colector:

Se obtiene y almacena empleando los mismos equipos que el medio continuo.

- Se añade 1 g de lecitina de soja por cada 100 g de aceite de oliva.
- Se añade después 1 mL de ácido acético por cada 50 mL de disolución (A. Acético concentrado al 2% v/v).
- Se homogeneiza la disolución empleando agitadores magnéticos.

**Síntesis de las microesferas**

Como se ha comentado previamente, las microesferas se obtienen gelificándolas, con lo que forman un hidrogel insoluble tras el entrecruzamiento, con una gran capacidad de retención de agua. Para que se produzca esta gelificación, se deben producir enlaces iónicos entre los iones  $\text{Ca}^+$  y las cadenas de alginato.

Se coloca la disolución de medio continuo en una jeringuilla de 6 mL de diámetro de émbolo 12,6 mm, y el medio discontinuo en una jeringuilla de 60 mL de diámetro 20 mm (medidos con el pie de rey). Se acopla cada jeringuilla a una bomba de jeringuilla diferente (NE 1000 higher pressure programmable single syringe pump y Standard PHD ULTRA™ CP Syringe Pump respectivamente). Una vez está el montaje listo, se ajustan los parámetros de flujo para cada medio. Se ensayaron distintos flujos tanto de medio continuo como discontinuo, llegando a unos valores óptimos de 1,55 mL/h en el medio discontinuo y 30 mL/h en el medio continuo para la serie utilizada en los cultivos celulares. Los tubos que salen de las jeringuillas se conectan al sistema de microfluídica de la forma representada en la Figura 13, cuyos canales son de un grosor de 0,5 mm.

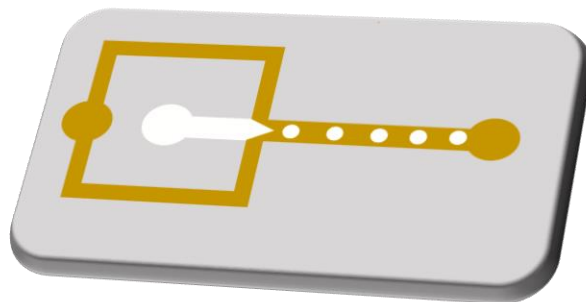


Figura 13. Sistema de microfluídica empleado en la síntesis de microesferas de alginato. El medio continuo es el amarillo y el discontinuo el blanco. Realizado por la autora empleando PowerPoint.

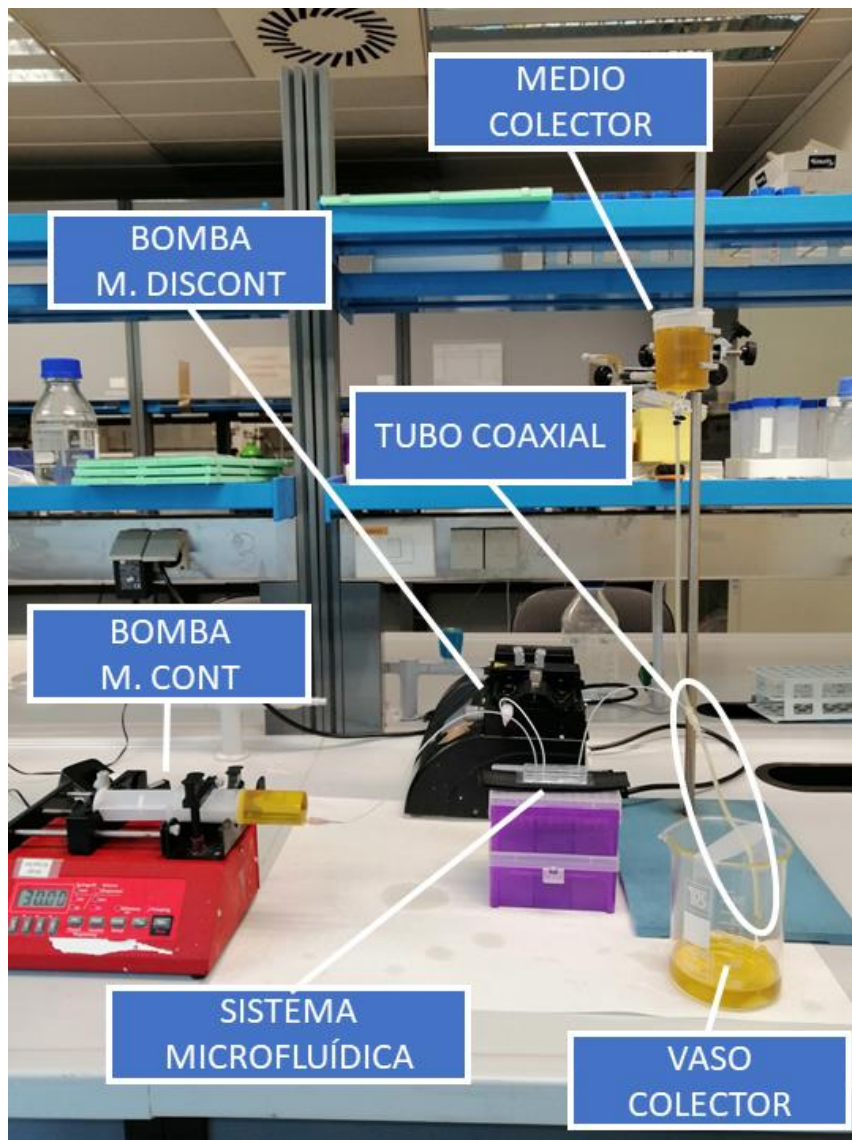


Figura 14. Montaje para la obtención de microesferas

El flujo de medio continuo provoca que el medio discontinuo se separe en partículas esféricas (microgotas) que, a la salida del circuito, no están reticuladas. Para reticularlas, unimos el extremo de salida del sistema a un tubo coaxial en el que las microesferas confluyen con el medio colector (ácido) que permite la disociación del carbonato cálcico, liberando iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos cationes se posicionan entre las cadenas de alginato que forman la microesfera, manteniéndolas unidas de forma iónica y estable. En ese momento ya están reticuladas las microesferas y caen en el vaso colector.

Tras la síntesis, se han de lavar y almacenar correctamente estas microesferas:

Primero se debe retirar el máximo de aceite posible empleando el tamizado de la solución del vaso colector. Se utiliza un falcon de 50 mL, y un acople para hacer vacío y un filtro de Pluriselect con un tamaño de poro acorde al tamaño de microesfera obtenido (40 y 60  $\mu\text{m}$  de luz de poro).

Una vez el aceite se ha retirado, se lavan las microesferas con cloroformo y se tamizan siguiendo el procedimiento anterior. El lavado con cloroformo se realiza en una vitrina de extracción de gases y es necesario para eliminar el aceite que queda entre las microesferas.

Finalmente, las microesferas se lavan con agua destilada y se tamizan de igual forma que antes y se almacenan en falcons de 50 o 15 mL, según la cantidad obtenida, y con un volumen acorde de agua miliQ o etanol 70%.

### 6.3. Funcionalización de microesferas

Para la funcionalización de las microesferas de este trabajo se ha escogido la técnica de *Layer by Layer* (LBL). Pese a que se han empleado 3 pares de materiales diferentes, con distinto número de capas y distinto entrecruzamiento, el protocolo para la deposición de los polielectrolitos se ha realizado de forma similar y empleando los mismos recursos del laboratorio.

Este proceso se repite 1 vez por cada bicapa del LBL y requiere de vasos de precipitados de 50 mL, tamices celulares de nylon de 70-40  $\mu\text{m}$ , pinceles de silicona, pipetas Pasteur, filtros de jeringa, jeringuillas y un agitador orbital PSU-2T de Biosan.

El proceso consiste en:

Se preparan las disoluciones correspondientes y se filtran, haciéndolas pasar por un filtro de PES con una jeringuilla, para eliminar impurezas. Una vez listas, se colocan en los vasos de precipitados correspondientes, siguiendo el esquema que observamos en la Figura 15. Los vasos se irán colocando en el agitador orbital conforme llegue su turno en el protocolo y el resto permanecerán en la bancada. La velocidad para el agitador no es relevante, pero debe ser suficiente como para mantener las microesferas en suspensión en cada vaso.

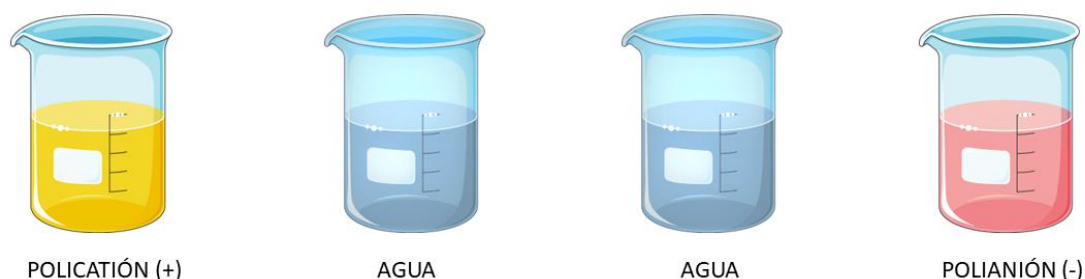


Figura 15. Colocación de las disoluciones para el LBL. Realizado por la autora con imágenes de Server Medical Art

Las microesferas se sacan de su almacenamiento y se sumergen primero en el policación del par seleccionado durante el tiempo que establezca el método seguido (Tabla 1). Transcurrido ese tiempo, se emplea una pipeta Pasteur para recoger las microesferas junto con la solución del policación. Se emplea un tamiz de nylon de 40-70  $\mu\text{m}$  para retener las microesferas y que la solución quede en otro vaso de precipitados.

Tabla 1. Distribución de tiempos de las fases del LBL

Parte del sistema \ Tipo LBL	Gel-Alg	Chi-Hep	PLL-Alg
Anión y catión	15 minutos	15 minutos	10 minutos
Lavados	5 minutos	5 minutos	5 minutos

En ese momento se sumergen las microesferas en un baño de agua para eliminar los residuos de policación presentes entre las microesferas. Para pasar al siguiente lavado, se recogen de

igual forma que antes y se pasan al siguiente vaso de lavado con agua. Después de este segundo lavado, se recogen las microesferas de forma similar y se pasan al vaso del polianión.

Las microesferas permanecen sumergidas en el polianión durante el tiempo establecido en el protocolo. Una vez pasado el tiempo, se sacan y, aunque se sigue el mismo proceso de antes para separarlas del medio líquido, se utilizan una pipeta Pasteur y un tamiz diferente para evitar que se mezclen los residuos de polianiones y policationes.

En ese momento, las microesferas pasan a un vaso de lavado, pero con agua limpia para evitar de nuevo que se mezclen residuos de los policationes y polianiones. Después del tiempo de lavado, se recogen con el tamiz y la Pasteur del polianión y se pasan al segundo vaso de lavado. Cuando se acaba el segundo lavado tras el baño en el polianión se ha logrado recubrir la microesfera con una bicapa de materiales.

Este proceso se repite de forma cíclica, cambiando el agua de los lavados en cada capa para todas las bicapas que se consideren necesarias o se quieran colocar sobre la microesfera.

### 6.3.1. LBL Gelatina-Alginato-Gelatina (LBL Gel-Alg)

El protocolo seguido para este par está basado en el de Ratanavaraporn et al. (Ratanavaraporn et al., 2019) y la mecánica es la explicada en el apartado anterior. En este trabajo las microesferas a las que se les aplica este par tienen 3 capas de materiales organizadas en gelatina-alginato-gelatina y se entrecruzan empleando glutaraldehído (GA).

Preparamos las diferentes soluciones:

#### Solución de Gel-A 0,1% p/v en agua miliQ (catión):

En función del volumen preparado se pesa la cantidad pertinente de gelatina tipo A de piel porcina en la balanza de precisión Mettler Toledo, modelo XS104 y se añade al volumen correspondiente de agua miliQ. La solución se debe mantener en agitación magnética a 37°C en una estufa a 37°C durante aproximadamente 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se ajusta el pH de esta solución a 7 empleando HCl y NaOH a diferentes concentraciones y el pH-metro PH50 marca Violab.

#### Solución de Alginato de sodio 0,1% p/v en agua miliQ (anión):

En función del volumen preparado se pesa en la balanza de precisión Mettler Toledo, modelo XS104 la cantidad pertinente de alginato de sodio y se añade al volumen de agua miliQ correspondiente. La solución se mantiene en agitación magnética en una estufa a 60°C durante aproximadamente 1 hora. Una vez disuelto el alginato, se ajusta el pH de la disolución a 7 empleando HCl y NaOH a distintas concentraciones y el pH-metro PH50 marca Violab.

#### Solución de glutaraldehído (GA) 0,25% p/v en agua miliQ:

Esta solución debe prepararse y emplearse en una vitrina de extracción de gases debido a su carácter tóxico. Para prepararla, se requiere de una dilución al 1:100 del stock que hay en el laboratorio (disolución acuosa al 25%). Una vez preparada la dilución, se deja homogeneizando en agitación magnética a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7 empleando NaOH y HCl a diferentes concentraciones y el pH-metro PH50 marca Violab.

Para neutralizar la citotoxicidad del GA, se prepara una solución de glicina. La glicina se unirá con su grupo amina al grupo aldehído libre del GA (que es lo que provoca su citotoxicidad (Equipo del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, n.d.)).

Solución de glicina 200 mM en agua miliQ:

Se pesa, en función del volumen que se necesite, la glicina en la balanza de precisión Mettler Toledo, modelo XS104. Una vez preparada la disolución, se deja homogeneizando en agitación magnética a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7 empleando NaOH y HCl a diferentes concentraciones y el pH-metro PH50 marca Violab.

Una vez se tienen las disoluciones, se prepara el agua para los lavados. Esta es agua miliQ a la que se le ha ajustado el pH a 7 empleando HCl y NaOH a diferentes concentraciones y el pH-metro marca Violab.

Para el LBL, se sigue el protocolo del apartado 6.3 de tal forma que las microesferas son recubiertas por 1,5 bicapas (2 capas de gelatina y una de alginato, siendo una bicapa colocar una capa de gelatina y sobre esta, otra de alginato):

Gelatina > Agua > Agua > Alginato > Agua > Agua > Gelatina > Agua > Agua

Tras ese último lavado comienza la fase de entrecruzamiento. Al usar glutaraldehído, es necesario que se realice en una vitrina de extracción de gases. Se dejarán las microesferas sumergidas en el GA durante 1 hora y en agitación constante con el agitador PSU-2T de Biosan. Después del entrecruzamiento, se realizan dos lavados en agua de 15 minutos cada uno a las microesferas resultantes. Finalmente, las microesferas se mantienen *overnight* en el baño de glicina (manteniendo la agitación constante).

Al día siguiente ya se pueden recoger las microesferas y almacenarlas en etanol 70%. El protocolo seguido para este par es propio, pero está basado en los de Long Li et al. (L. Li et al., 2020) y X Li et al 2017 (X. Li et al., 2017).

### 6.3.2. LBL Quitosano-Heparina, Chi-Hep

Los pasos para obtener el recubrimiento son los explicados en el apartado 6.3. En este trabajo las microesferas a las que se les aplica este par tienen 3 bicapas (siendo una bicapa un recubrimiento de quitosano y sobre este, un recubrimiento de heparina) y se entrecruzan empleando EDC-NHS.

Preparamos las diferentes soluciones:

Solución de quitosano 0,1% p/v en agua miliQ y 0,1 M á. acético (catión):

En función del volumen que se busque preparar, se prepara agua miliQ con una concentración 0,1 M de ácido acético. Este pH ácido hará que, tras un día en agitación magnética, el quitosano pesado en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104, se disuelva. Luego de eso se añade la sal común necesaria para tener una concentración de 0,25 M. Cuando está todo disuelto, se ajusta el pH a 5,5 empleando ácido acético y NaOH a distintas concentraciones y el pH-metro marca Violab.

Solución de heparina 0,1% p/v en agua miliQ y 0,25 M NaCl (anión):

En función del volumen preparado se pesa la cantidad pertinente de heparina en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104 y se añade al volumen correspondiente de agua miliQ.



La solución se debe mantener en agitación magnética a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se añade la sal común necesaria para lograr la concentración especificada y se ajusta el pH a 5,5 empleando ácido acético y NaOH a diferentes concentraciones y el pH-metro marca Violab.

Agua para lavados con 0,25 M NaCl:

Se pesa la cantidad de sal común necesaria para obtener la concentración requerida. Se añade al agua miliQ y se disuelve empleando un agitador magnético. Una vez la sal está disuelta se ajusta el pH del agua a 5,5 empleando á. acético y NaOH a diferentes concentraciones y el pH-metro marca Violab.

Solución de EDC 0,06 M, NHS 0,03 M y 0,25 M NaCl en agua miliQ:

Se pesan la sal común, el NHS y el EDC en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104. Para pesar el EDC es necesario emplear una máscara de partículas. Se añaden ambas masas al volumen de agua miliQ especificado. Una vez preparada la disolución, se deja homogeneizando en agitación magnética a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 7 empleando NaOH y HCl a diferentes concentraciones y el pH-metro marca Violab.

Una vez se tienen las disoluciones, se sigue el protocolo del apartado 6.3 de tal forma que las microesferas son recubiertas por 3 bicapas:

Quitosano > Agua > Agua > Heparina > Agua > Agua > Quitosano > Agua > Agua > Heparina > Agua > Agua > Quitosano > Agua > Agua > Heparina > Agua > Agua

Tras ese último lavado, comienza la fase de entrecruzamiento. Se dejan las microesferas sumergidas en la solución de EDC/NHS *overnight* en agitación constante con el agitador orbital PSU-2T de Biosan.

Al día siguiente, se lavan las microesferas con agua miliQ para eliminar restos de los entrecruzadores y se almacenan en etanol 70%.

6.3.3. LBL Poli-L-Lisina-Alginato (LBL PLL-Alg)

El protocolo seguido para este par está basado en el de Clara Correia et al 2013 (Correia et al., 2013). Los pasos para obtener el recubrimiento son los explicados en el apartado 6.3. En este trabajo las microesferas a las que les aplicamos este par tienen 2 bicapas (siendo una bicapa la que se forma por la PLL y después una capa de alginato) y no se entrecruzan.

Preparamos las diferentes soluciones:

Solución de Poli-L-Lisina 0,05% p/v en agua miliQ y 0,15 M NaCl (catión):

Primero preparamos una disolución stock de 0,1% p/v de PLL en agua miliQ. Para ello, se descongela la PLL y se pesa en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104 y directamente en el frasco Pirex en el que se va a mantener la solución. Se añade al agua miliQ que se necesite para mantener la concentración y se agita a temperatura ambiente durante 1 h aproximadamente.

De esa disolución de stock es de la que se prepara la disolución de 0,05% p/v. Se añaden agua miliQ y PLL stock en una proporción 50/50 v/v y se deja en agitación magnética. Mientras, se pesa la sal común necesaria y se añade. Una vez está todo disuelto, se ajusta el pH a 7 empleando HCl y NaOH a distintas concentraciones en el pH-metro PH50 de Violab.

Solución de Alginato 0,05% p/v en agua miliQ y 0,15 M NaCl (anión):

En función del volumen necesario, se pesa la cantidad pertinente de alginato de sodio en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104 y de sal común. Estas masas se añaden al volumen correspondiente de agua miliQ y se mantiene en agitación magnética en una estufa o en un agitador con temperatura a 60°C durante aproximadamente 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se ajusta el pH a 7 empleando HCl y NaOH a diferentes concentraciones en el pH-metro PH50 de Violab.

Agua para lavados con 0,15 M NaCl:

Se pesa la cantidad de sal común en la balanza de precisión Mettler Toledo modelo XS104 necesaria para obtener la concentración requerida. Se añade al agua miliQ y se disuelve empleando un agitador magnético. Una vez la sal está disuelta se ajusta el pH del agua a 7 empleando HCl y NaOH a diferentes concentraciones en el pH-metro PH50 de Violab.

Una vez se tienen las disoluciones, se sigue el protocolo del apartado 6.3 de tal forma que las microesferas son recubiertas por 2 bicapas:

PLL > Agua > Agua > Alginato > Agua > Agua > PLL > Agua > Agua > Alginato > Agua > Agua

Tras ese último lavado, como no se entrecruzan, se almacenan directamente en etanol 70%.

A modo de resumen del apartado, se quiere dejar constancia de los recubrimientos caracterizados finalmente en este TFM y sus propiedades principales (Tabla 2):

*Tabla 2. Resumen de los aspectos más importantes de cada microesfera realizado en el presente TFM*

Nombre	Polianión	Policitación	Capas	Entrecruzamiento
mo alginato	Microesferas de alginato al 1% puro sin recubrir y entrecruzadas iónicamente con Ca <sup>2+</sup>			
mo LBL Gel-Alg	Alginato	Gelatina	1 de alginato y 2 gelatina	Glutaraldehído
mo LBL Chi-Hep	Heparina	Quitosano	3 de quitosano y 3 de heparina	EDC/NHS
mo LBL PLL-Alg	Alginato	PLL	2 de PLL y 2 de Alginato	Sin entrecruzar

## 6.4. Caracterización morfológica

### 6.4.1. Microscopía óptica

Para ver la forma de las microesferas y su distribución de tamaños, así como para medir su diámetro, y comprobar la presencia de algún material específico, se han empleado diferentes equipos de microscopía óptica con cámaras fotográficas integradas.

En primer lugar, se observaron las microesferas en el microscopio óptico invertido. El modelo empleado fue el Nikon Eclipse TS100-F que tiene integrado una cámara fotográfica con la que se pueden almacenar imágenes. Este equipo puede adquirir imágenes en un rango de 100 a 400



aumentos. También se usará para medir los diámetros de las microesferas obtenidas, para ver cómo evoluciona el cultivo celular y además para realizar el ensayo de estabilidad. Por otro lado, el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) del CBIT, permite detectar la fluorescencia de la muestra, incluso la autofluorescencia de los materiales. Por lo tanto, se emplea para ver de forma cualitativa si hay quitosano en las muestras de LBL Chi-Hep.

El análisis de diámetros de las microesferas y el montaje de las fotos de microscopía de fluorescencia se ha realizado empleando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

#### 6.4.2. CrioFESEM

El nombre de esta técnica de microscopía electrónica viene de la unión de crio, relacionado con temperaturas extremadamente bajas y FESEM, que en inglés se refieren a “Field Emission Scanning Electron Microscopy”. Por lo tanto, esta técnica es la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo, pero empleando como muestras elementos criogenizados. Esta técnica permite observar la superficie y la morfológica de muestras húmedas sólidas y líquidas sin deformarlas (*Crio-SEM | Microscopía Electrónica*, n.d.).

Para poder utilizar esta técnica, se debe acudir al servicio de microscopía de la UPV, donde poseen un equipo de FESEM modelo ZEISS ULTRA 55, un equipo para criofijar la muestra y un equipo técnico que sirve de apoyo para usarlo correctamente.

Los pasos seguidos para observar cada muestra los realiza este equipo, y en este trabajo es el siguiente:

En primer lugar, se procede a la criofijación las muestras a la máxima velocidad posible. Para ello, se colocan en el portaobjetos adecuado, que se escoge en función del estado de la muestra (si es líquido, se usan unos tipos, y si es sólido, otros). Con el portaobjetos cargado con las muestras, se procede a congelar la muestra introduciéndola en un baño de nitrógeno nieve. El nitrógeno nieve es nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  que cuando entra en contacto con la muestra, se evapora congelando la muestra y vitrificando el hielo. Este paso es relevante puesto que, a mayor vitrificación del hielo (más rápido congeles y de forma más homogénea), más auténtica es la estructura obtenida en la criofijación (Rubino et al., 2014).

Una vez se han congelado la muestra, se traslada la muestra en vacío a la precámara del equipo FESEM. En este equipo, como lo que interesa es observar qué hay dentro de las microesferas y su superficie, se fractura la muestra con un “cuchillo frío” lo que genera un corte transversal. Una vez se tiene el corte listo, se sublima el agua de la superficie de las muestras a alto vacío siguiendo el protocolo estándar del servicio de microscopía (dura 10 minutos). La sublimación termina y la temperatura se estabiliza en  $-90^{\circ}\text{C}$ .

Para permitir la conductividad de la muestra biológica, se debe realizar un recubrimiento ínfimo con argón gas durante 3 segundos. Este recubrimiento es el menor posible por aplicar. Después de dicho recubrimiento, se pasan las muestras al microscopio electrónico SEM y se adquieren imágenes usando un haz de electrones de 1 KeV.

En este trabajo, se llevaron muestras de los dos pares que interesaba analizar topográfica e internamente (mo LBL Gel-Alg y mo LBL Chi-Hep) junto con muestras de microesferas de alginato como control.

## 6.5. Caracterización bioquímica

Se usarán diferentes ensayos para comprobar la presencia específica de las biomoléculas en los recubrimientos. Para detectar los materiales de forma inespecífica se empleará el FTIR y el TGA. Para la detección y cuantificación de gelatina se hará uso del el ensayo de BCA, para la heparina, el ensayo Blyscan y para el PLL, el ensayo de ninhidrina.

### 6.5.1. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

El FTIR permite reconocer la composición de los materiales a través de la radiación en el espectro infrarrojo. El equipo emite hacia la muestra radiación de infrarrojos, y una parte es absorbida por el material y otra es transmitida por este mismo. Esta última es la que se empleará en el trabajo, ya que es la que forma el espectro y la que es captada por el receptor de nuestro equipo (espectrómetro ALPHA FT-IR (Bruker)). Estos espectros permiten conocer el tipo de material que forma la muestra debido a que cada molécula, grupo funcional y enlace tiene una serie de picos de absorción característicos en el infrarrojo. También es necesario recordar que la transmitancia es la relación entre la energía transmitida a través de una sustancia y la energía total incidente y la absorbancia es el logaritmo de la inversa de la transmitancia (Abril Díaz et al., n.d.).

Se va a analizar el espectro desde la longitud de onda ( $\lambda$ )  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta la  $400\text{ cm}^{-1}$ , con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras que se van a analizar son todos los tipos de microesferas obtenidos en el trabajo: microesferas de alginato, LBL Gel-Alg, LBL Chi-Hep y LBL PLL-Alg. Con esta técnica, se identificarán los picos característicos de los materiales en el espectro, aunque no se podrá cuantificar cuánto hay de cada material.

Además, se van a representar los resultados empleando el programa gráfico Origin.

### 6.5.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) permite determinar la estabilidad térmica de un material y la fracción de componentes volátiles que contiene. Para ello la termogravimetría mide con gran sensibilidad,  $10^{-6}\text{ g}$ , el peso de la muestra mientras esta se va calentando a una velocidad constante. Cuando en el barrido de calentamiento se alcanzan valores de la energía térmica que superan las energías de enlace de los distintos enlaces químicos de la molécula, se desprenden fracciones de la molécula volátiles y se detecta una disminución de la masa. Para evitar interferencias de agentes externos, en particular la combustión con el oxígeno del aire, en la medida del peso, la microbalanza se encuentra en una cámara en la que el equipo puede generar atmósferas inertes de gases como el helio, argón o nitrógeno (Rajisha et al., 2011).

Los parámetros del experimento se configuran en el ordenador asociado al equipo de TGA (Thermal analysis excellence TGA/DSC 2, Mettler Toledo), y estos son: velocidad de calentamiento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  y flujo de nitrógeno de  $50\text{ mL}/\text{min}$ . Se ha trabajado con muestras de peso inicial aproximado a  $55\text{ mg}$ .

Esta técnica se emplea en el presente trabajo para demostrar que existe una parte de las microesferas LBL Chi-Hep, LBL Gel-Alg y LBL PLL-Alg que es efectivamente ese recubrimiento. Para ello se han comparado las derivadas del peso (normalizado al peso en seco) con respecto a la temperatura de las microesferas funcionalizadas con las microesferas de alginato sin funcionalizar, que no llevaban recubrimiento.

Se ha generado un Excel en el que se han estudiado las degradaciones y las derivadas de las degradaciones. Para la derivada, además, es necesario normalizar por el peso en seco de la muestra, que es el que queda una vez se ha evaporado toda el agua. Se observa que el alginato posee una degradación característica, modelizable con la suma de dos curvas normales, entre los 200 y los 400°C. Por tanto, la comparación se ha realizado generando 2 curvas normales que sumadas, representarían la curva de la derivada del peso/temperatura en cada serie de LBL y viendo que aspectos eran diferentes con respecto a la de alginato.

### 6.5.3. BCA

El BCA es un ensayo colorimétrico capaz de determinar la concentración de diferentes proteínas. Está basado en la reacción de reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  al  $\text{Cu}^+$  por la unión del cobre en las proteínas en medios alcalinos y la detección de los iones  $\text{Cu}^+$  liberados al medio en la reducción por su unión al ácido bicinconínico (BCA). Al unirse a este ácido, se pone de color púrpura, y cuantos más complejos de BCA con cobre haya, más púrpura será. La coloración se convierte en concentración de proteína si se realiza una curva de calibrado con concentraciones conocidas de la proteína objetivo, leyendo el sobrenadante púrpura a 562 nm de longitud de onda (*BCA Assay | Thermo Fisher Scientific*, n.d.).

En este trabajo, se emplea el kit de Thermo Fisher del BCA y el protocolo que facilita la casa para las muestras que van en placas. Las muestras que se van a analizar con este método son las microesferas de alginato como control y las de LBL Gel-Alg. Se realiza una curva de calibrado que va desde 1 mg/mL de gelatina al blanco (0 mg/mL de gelatina).

Para este ensayo se preparan 2 réplicas biológicas de la curva de calibrado y 4 de cada tipo de microesfera y se les aplica el método que facilita la casa comercial Thermo Fisher (*BCA Assay | Thermo Fisher Scientific*, n.d.). A grandes rasgos, este método requiere la incubación de 50  $\mu\text{L}$  de las muestras y las soluciones de la curva de calibrado con 400  $\mu\text{L}$  de *working reagent* por 2h a 37°C. Luego, se leen las absorbancias empleando el espectrofotómetro de placas (Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector) y una placa multipocillo P96 transparente.

Los resultados del lector se analizan en una hoja de cálculo Excel y se convierten a concentraciones de gelatina por mL de microesferas. Los resultados se representan empleando GraphPad.

### 6.5.4. BLYSCAN

El Blyscan es un ensayo colorimétrico capaz de determinar la concentración de glucosaminoglicanos (GAG's) sulfatados. Está basado en la conversión de un reactivo azul (azul 9-dimetil-metileno) a rosa cuando se une a estos GAG's sulfatados. Para poder leer la absorbancia en el Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector se emplea otra solución el kit que separa, empleando sales de sodio, los GAG's del reactivo azul. Ese sobrenadante resultante, es el que se lee a una longitud de onda de 652 nm (Bicolor company, n.d.). Se puede conocer la concentración de esos GAG's sulfatados en la muestra si se han preparado las disoluciones necesarias del GAG en cuestión para realizar una curva de calibrado.

En este trabajo, se emplea el kit de Bicolor de Blyscan y el protocolo que facilita la casa para realizar el ensayo. Las muestras que se van a analizar con este método son las microesferas de alginato y las de LBL Chi-Hep después de estar en medio de cultivo (RPMI 1640) durante un

tiempo (LBL Chi-Hep (RPMI 1640)) y habiendo estado el mismo tiempo en agua (LBL Chi-Hep (agua)).

Se realiza una curva de calibrado que va desde 0,5 a 5  $\mu\text{g}$  de heparina, que se comparará con dos los tres tipos de microesferas. Para este ensayo se preparan 2 réplicas biológicas de la curva de calibrado, 3 de cada tipo de microesfera y 3 réplicas técnicas por cada biológica.

Para la preparación de las muestras y de la curva de calibrado, es necesario añadir 1 mL de *Blyscan Dye reagent* a las muestras y dejarlas 30 minutos en agitación. Luego se centrifuga a 13000 rpm 10 minutos y se elimina el sobrenadante. Finalmente, se añaden 0,5 mL de *Dissociaton reagent* y se agitan las muestras 10 minutos hasta la liberación del reactivo que se ha unido a la heparina y le da el color azul al sobrenadante. En ese momento se leen las absorbancias empleando lector de placas (Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector) y una P96 transparente. Los resultados se convierten a masa de heparina por 10  $\mu\text{L}$  de microesferas empleando Excel y GraphPad.

#### 6.5.5. NINHIDRINA

El ensayo de ninhidrina es un ensayo colorimétrico capaz de detectar y determinar la cantidad de grupos amino que hay en una muestra. Está basado la reacción de la ninhidrina con los grupos amina de la molécula de interés, que son muchos. Esta reacción da un cambio de color que se puede medir con el Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector a 570 nm de longitud de onda. Para convertir esa absorbancia a masa de la molécula presente en la muestra, es necesario preparar una curva de calibrado con concentraciones de la molécula de interés u otra que posea la misma cantidad de grupos amino. Sin embargo, en este trabajo se ha utilizado sólo como un análisis cualitativo para mostrar la presencia de PLL en el recubrimiento de muestras PLL-Alg

Las muestras que se van a analizar con este método son las microesferas de alginato y las de LBL PLL-Alg.

En este trabajo, se emplean los reactivos acetato de litio, ácido acético, ninhidrina, hidrindantina y etilenglicol, además de un protocolo basado en el de Algieri et al 2017 (Algieri et al., 2017):

Para un ensayo, se preparan en primer lugar 10 mL de buffer de acetato de litio 4M (6 mL de agua y 4,08 g) ajustado a pH 5,2 con á. acético y NaOH con el pH-metro PH50 de Violab. Por otro lado, se preparan 40 mL de etilenglicol con 0,8 g de ninhidrina y 0,12 g de hidrindantina. Luego, se juntan ambas disoluciones y se mantiene en agitación magnética durante 1h a temperatura ambiente en un agitador magnético (o más tiempo si no se ha producido el cambio de coloración a amarillo claro).

Una vez la disolución pasa de un morado oscuro a un color amarillento, se añaden 2 mL de la solución de ninhidrina a 20  $\mu\text{L}$  de muestra (de interés o para el patrón) y se incuba a 100<sup>o</sup> C durante 20 minutos en el Baño térmico Digiterm 200P SELECTA. Tras este tiempo, el cambio de coloración de las microesferas con grupos amina y el sobrenadante será evidente y se podrá evaluar cualitativamente.

#### 6.6. Prueba de estabilidad

La prueba de estabilidad es una forma cualitativa de ver en qué medios líquidos las microesferas sintetizadas mantienen la estructura reticulada y se mantienen insolubles. Dado que los puntos

de entrecruzamiento en la red de alginato son de tipo iónico, son reversibles, y pueden perderse al migrar los iones  $Ca^{2+}$  que los forman hacia el medio en el que se sumergen las microesferas. La estabilidad del microgel es necesaria, por supuesto, para los cultivos celulares por lo que se harán pruebas en los medios de cultivo de interés en el MM (RPMI 1640). Además, como esta plataforma está basada en microgeles con microcápsulas huecas, es importante poder obtenerlas para el cultivo, para lo que el interior debe estar licuado o reemplazado. Para este propósito, las microesferas deberán pasar por un agente quelante del calcio que provoque la salida de los iones calcio del cuerpo de la microesfera. Por esta razón, se estudia la resistencia de las microesferas al EDTA. También se harán pruebas en las distintas disoluciones de polielectrolitos para comprobar que ninguno de ellos afecta negativamente al proceso de LBL provocado la ruptura de las microesferas.

Por lo tanto, en esta prueba se colocarán todos los tipos de microesfera sintetizados en el trabajo en una placa P96. Cada tipo de microesfera se sumergirá en el medio que no esté tachado con una cruz en la Tabla 3:

Tabla 3. Condiciones y pruebas del ensayo de estabilidad.

	Agua sin NaCl (pH 7)	Agua con NaCl 0,25M (pH 5,5)	Alginato 1mg/mL pH 7	Gelatina 1mg/mL pH 7	Heparina 1mg/mL 0,25M NaCl pH 5,5	Quitosan o 1mg/mL 0,25M NaCl pH 5,5	PLL 1mg/mL pH 7	EDTA	RPMI 1640
mo alginato				é					
mo LBL CHIT-HEP	X		X	X			X		
mo LBL PLL-ALG		X		X	X	X			
mo LBL GEL-ALG		X			X	X	X		

Para evaluar la estabilidad de las microesferas, se visualizarán tras 1h, 1 día, 3 días y 7 días en las diferentes soluciones empleando el microscopio óptico invertido Eclipse TS100.

## 6.7. Cultivo celular

El presente trabajo tiene como objetivo principal la puesta a punto de una nueva plataforma de cultivo de células de mieloma múltiple. Uno de los elementos esenciales en el cultivo es el proceso de agitación que mantiene la suspensión de microesferas y células en el medio líquido. En este trabajo hemos diseñado un protocolo basado en la agitación en modo de vaivén de criotubos Eppendorf, buscando por una parte poder realizar el cultivo con las menores cantidades de material y células posible y por otro, que la suspensión se mantenga con una agitación suave que dañe lo mínimo a las células. Por lo tanto, en este cultivo se pretende probar el concepto del microgel en el criotubo y la agitación con el equipo "Agitador de laboratorio de movimiento alternativo Multi Bio RS-24 (Biosan)"

Para realizar el cultivo celular se emplean células de mieloma múltiple de la línea celular RPMI 8226 (MM). El cultivo se realiza en criotubos de 2 mL (Thermo Fisher) y con una agitación constante motivada por el agitador multi Bio RS-24 en el equipo de incubación a 37°C.

Habrà 3 series de muestras en cultivo: suspensión de células, suspensión de células + microesferas (mo) LBL PLL-ALg y suspensión de células + microesferas (mo) LBL Chi-Hep. La duración de este experimento es de 5 días y se comprueba la proliferación de las células mediante la medida del ADN total con el ensayo PicoGreen a 3 y 5 días.

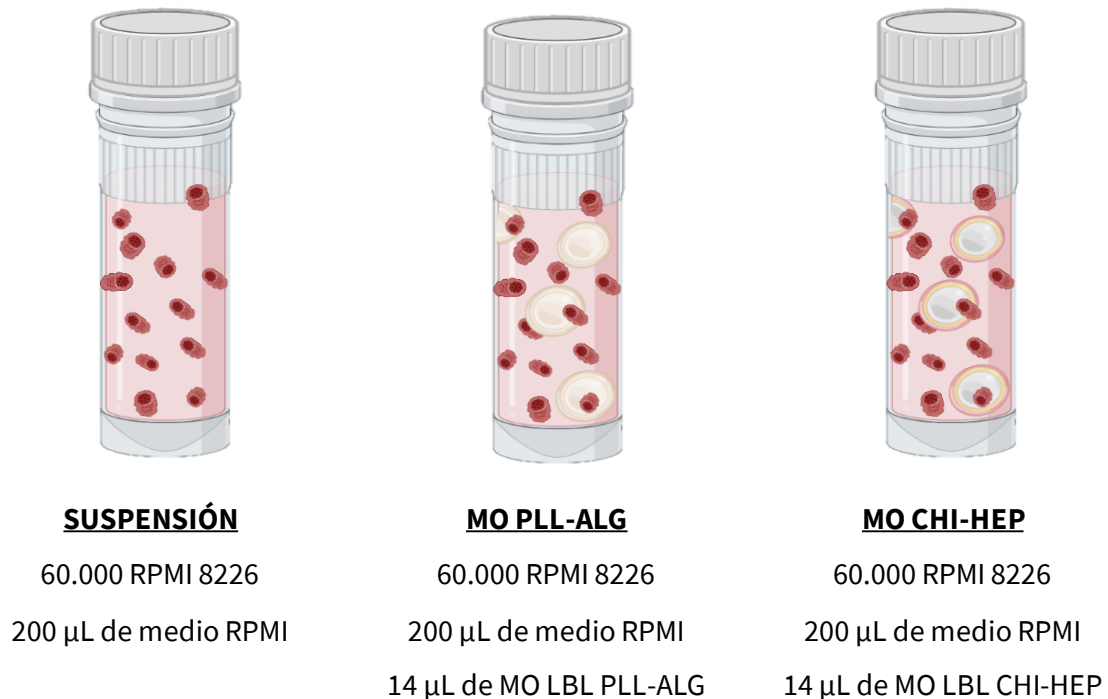


Figura 16. Esquema de las series de cultivo y componentes. Realizado por la autora empleando PowerPoint

### 6.7.1. Descongelado de células y expansión

La manipulación de los materiales, medios, tubos, viales y células que van a emplearse en el cultivo debe realizarse lo más aséptica posible para evitar contaminaciones. Esto implica trabajar únicamente en las cabinas de flujo laminar, desinfectar lo necesario con etanol 70% y utilizar fungibles estériles o autoclavados.

Para la realización del cultivo, primero es necesario descongelar y expandir las MMC. Para ello se siguen las instrucciones de la ATCC, que es el banco que provee al CBIT de las células RPMI 8226.

Antes de descongelar las células, es necesario preparar un volumen suficiente para la fase de expansión celular de medio de cultivo. Este medio de cultivo se compone de un 88% de medio de cultivo RPMI 1640, un 10 % de suero fetal bobino (FBS), un 1% de L-Glutamina y un 1% de Penicilina-Estreptomicina (P/S). Se prepara un tubo falcon de medio con los volúmenes correspondientes de cada componente en una cabina de flujo laminar. Antes de añadir cada volumen, estos se filtran con un filtro de jeringa de 0,2 µm. Cuando el medio está listo, se cierra y se deja en un baño a 37° C. Mientras, se procede a la descongelación de las células. Siempre

que el medio no se esté utilizando, se debe de mantener cerrado en el baño a 37°C (Baño termostático BAE 04, raypar) para mantener el pH óptimo 7-7,6.

Para descongelar las células, se deja el criotubo en un baño a 37° C. Cuando el contenido se ha aatemperado con el baño, se centrifuga el criotubo con las células y el medio de criopreservación. Se elimina este medio (sobrenadante) y se resuspende el *pellet* de células con medio de cultivo. Tras resuspender el *pellet*, se pasa el contenido del criotubo a un falcon de 15 mL en el que se añade medio de cultivo hasta los 9 mL. Este falcon se centrifuga a 125 G por 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se vuelve a resuspender el *pellet* de células con medio de cultivo. Estos pasos deben hacerse con celeridad para evitar comprometer la viabilidad de las células, ya que el medio de criopreservación contiene un 10 % v/v de dimetilsulfóxido (DMSO), que es tóxico a temperatura ambiente. Una vez las células están en un medio sin componentes tóxicos, se pasan a un flascón T25 (que se usará en posición vertical porque esta línea celular es no adherente). El flascón se deja incubando en un incubador con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. La densidad de células al inicio de la fase de expansión era de 5 millones en 10 mL de medio de cultivo.

Para cambiar el medio de las células, lo que se hace en la fase de expansión y en la de cultivo es diferente. En expansión, se duplica el volumen que hay en el flascón cada 2 días. Si se viera que se va a superar el volumen que cabe en el T25, se debe trasladar a un T75.

#### 6.7.2. Esterilización de materiales

Para comenzar el cultivo, es necesario preparar y desinfectar un día antes los materiales que se van a emplear (mo LBL PLL-Alg y mo LBL Chi-Hep y criotubos).

Para las microesferas, se preparan en la campana de flujo laminar y en esterilidad los 3 baños por los que van a pasar estas:

##### Etanol 70% (ETOH 70) enriquecido con un 1% de cloruro cálcico (ClCa<sub>2</sub>):

Se preparan 500 mL de la solución, por lo que se pesan 5 g de ClCa<sub>2</sub> y se disuelven en el etanol por agitación manual. Luego, se filtra 2 veces la solución con filtros de jeringa de 0,22 µm.

##### Suero salino enriquecido con un 1% de cloruro cálcico (ClCa<sub>2</sub>):

Se prepara 1 litro de esta solución con 1 litro de agua miliQ, 9 g de NaCl y 10 g de ClCa<sub>2</sub>. Una vez disuelto, se filtra 2 veces de la misma forma que el etanol 70%.

##### Medio de cultivo RPMI sin FBS.

Se prepara utilizando un 98% de medio de cultivo RPMI 1460, un 1% de P/S y 1% de L-Glutamina. No se añade el 10% de FBS en este caso debido a que este es un cóctel de proteínas del cual no se conocen las concentraciones ni la composición exacta. Como esas proteínas podrían adsorberse sobre la superficie de las microesferas y en nuestro estudio interesa determinar la respuesta a las biomoléculas específicas que se han introducido en la síntesis de las microesferas, utilizaremos medio sin FBS hasta los primeros cambios de medio de cultivo.

Una vez se tienen las 3 soluciones preparadas, se sumergen las microesferas en los baños por 10 minutos cada vez, siguiendo el siguiente orden:

ETOH 70 > ETOH 70 > ETOH 70 > Suero salino > Suero salino > Suero salino > RPMI sin FBS

El RPMI sin FBS se deja *overnight*.



Para desinfectar y esterilizar los criotubos, se va a realizar un proceso diferente:

Se agujerean las tapas del número de criotubos necesario para el cultivo (y alguno de reserva) con una aguja 4 veces. Estos agujeros son necesarios para permitir el intercambio de gases durante el cultivo, ya que es el propio tubo la plataforma de cultivo. Después, se introducen en un frasco de vidrio con tapa de rosca y se autoclavan durante 15 minutos a 121°C. Una vez autoclavados, se almacenan dentro del frasco cerrado hasta el día del cultivo.

### 6.7.3. Cultivo celular

El cultivo celular va a realizarse en criotubos y con 3 condiciones diferentes. Las 3 condiciones que se van a probar son suspensión de células, suspensión de células + microesferas LBL PLL-Alg, que será el material sin propósito y suspensión de células + microesferas LBL Chi-Hep que es el material de interés.

Se van a colocar el máximo de criotubos que caben en el agitador rotacional, que son 26 para este cultivo. Estos se van a repartir teniendo en cuenta que se requieren 4 réplicas por cada tiempo de ensayo de PicoGreen y por condición. Como se ha comentado previamente, los tiempos para el ensayo de proliferación serán 3 y 5 días, y las condiciones serán 3, lo que hace un total de 8 tubos por condición.

El volumen total de cada muestra en el criotubo es de 200  $\mu\text{L}$  y en ese volumen habrá  $6 \cdot 10^4$  MMCs, medio de cultivo con FBS y 14  $\mu\text{L}$  de microesferas en los tubos que las contengan (concentración de microesferas del 7%). Esquemáticamente, la organización de los criotubos y lo que contienen en cada condición se observa en la Figura 16.

Para lograr tener eso en cada criotubo, es necesario seguir el siguiente proceso:

Se preparan todas las soluciones necesarias para el cultivo. En este caso, lo que se necesita es únicamente preparar medio de cultivo siguiendo las indicaciones del apartado de expansión celular.

Para las células, se recoge todo el volumen de suspensión del flascón de expansión. Se mide con la cámara Neubauer la concentración que hay en ese momento de células en la suspensión. Se diluye la suspensión para obtener al menos 2400  $\mu\text{L}$  de suspensión con una concentración celular  $6 \cdot 10^4$  células por 100  $\mu\text{L}$ .

Para las microesferas, en ambos tipos, lo primero que se hace es eliminar el medio de cultivo sin FBS. Se resuspenden las microesferas en medio de cultivo para obtener una concentración de 14  $\mu\text{L}$  de microesferas por cada 100  $\mu\text{L}$  de suspensión. Igual que con las células, hay que tener en cuenta que hay que preparar al menos 800  $\mu\text{L}$  de mezcla de microesferas y medio para poder llenar todos los criotubos de cada condición. Estas suspensiones reciben el nombre de “suspensión PLL” y “suspensión HEP” en este TFM.

Una vez se tienen las mezclas con las concentraciones listas, se rotulan los criotubos y se añaden con una micropipeta los volúmenes correspondientes:

- Serie 1: suspensión células

En estos tubos se añaden 100  $\mu\text{L}$  de suspensión celular y 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI sin células.

- Serie 2: suspensión celular + microesferas control



En estos tubos se añaden 100 µL de suspensión celular y 100 µL de suspensión PLL.

- Serie 3: suspensión celular + microesferas de interés o LBL

En estos tubos se añaden 100 µL de suspensión celular y 100 µL de suspensión HEP

Una vez están los criotubos cerrados, se colocan los tubos en los huecos del agitador rotacional. La plataforma del agitador ya con los tubos se tapa con papel de aluminio y se lleva al incubador, donde se coloca en su posición y se comienza la agitación.

Los parámetros de agitación definen una oscilación de  $\pm 60^\circ$  y una velocidad de 5 rpm.

Una vez cada día de cultivo, se desmonta la plataforma y se saca del incubador con todos los tubos tapada con papel de plata (desinfectado previamente). En la cabina de flujo laminar se cambia el medio duplicando el que hay (añadir 200 µL más), dejando 1 hora sin agitación los tubos y retirando el mismo volumen añadido (200 µL).

#### 6.7.4. Proliferación

El ensayo de PicoGreen permite cuantificar la cantidad de ADN de doble hebra que hay en una muestra, lo que se puede convertir en cantidad de células en dicha muestra si se conoce el ADN presente en ese tipo de célula. Para realizar con éxito este ensayo, es necesario digerir completamente las células presentes en la muestra.

En este trabajo, la enzima seleccionada para ese cometido es la papaína. Además, como los reactivos necesarios son costosos de producir y fotosensibles, se congelarán todas las muestras de 3 y 5 días a  $-80^\circ\text{C}$  para analizarlas todas de 1 vez. De igual manera, en este trabajo se realiza el ensayo a dos tipos de muestras distintas, los recipientes y los contenidos de cada criotubo. Esto forma parte de la comprobación de la viabilidad de la plataforma de cultivo.

Por lo tanto, cuando llega el momento (tiempo de ensayo estipulado) se congelan ambos tipos de muestras. El primer tipo de muestra es el criotubo vacío a 3 y 5 días y el segundo tipo es toda la suspensión de microesferas y/o células que había en cada criotubo a días 3 y 5. Las muestras de suspensión deben pasarse a otros tubos eppendorf de 1,5 mL con tapa de rosca para congelarlas porque el criotubo no cabe en la centrífuga. Las muestras que se congelaban no reciben el cambio de medio, puesto que mueren en el instante en el que se introducen en el congelador.

Una vez finalizado el cultivo, se procede a realizar el ensayo de cuantificación del ADN, uno por cada tipo de muestra del trabajo. Esto permitirá comprobar si en las paredes del tubo se quedaban adheridas las células de mieloma múltiple o no. Para ambos ensayos se tardan 2 días, el primero en el que se digiere la muestra *overnight* y el segundo, en el que se lee la absorbancia en el Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector y se obtiene la cantidad de ADN.

Para el primer día, mientras se descongelan las muestras, se preparan las soluciones necesarias para realizar esta prueba siguiendo el protocolo del kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, 2008):

#### Solución de $\text{Na}_2\text{EDTA}2\text{H}_2\text{O}$ ( $V_f = 100 \text{ mL}$ ) :

Se disuelven en 70 mL de agua miliQ 18,6 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}2\text{H}_2\text{O}$ . Después se ajusta el pH hasta 8 con NaOH 10 M y se enrasa hasta 100 mL con más agua miliQ. Esta solución se filtra y luego se autoclava para esterilizarla.

Buffer de Papaina (PBE) (Vf = 100 mL):

Se añaden 90 mL de agua miliQ y se disuelven en ella 0,653 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,648 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Una vez disuelto añadir 1 mL de EDTA 500 mM y ajustar el pH a 6,5 usando ácido clorhídrico. Enrasar a 100 mL usando un vaso graduado, esterilizar filtrando la solución y guardar en la nevera.

Para que funcione y digiera en las células de la muestra, es necesario activar este buffer. Cada muestra biológica requiere 300 µL de PBE buffer se activa solo una parte de lo preparado, en función de las muestras que se tenga. Para esta activación, se añaden 60 mg de clorhidrato de L-cisteína hidrato y se filtra. Se comprueba el volumen que ha quedado tras el filtrado y se añaden 125 microgramos por mililitro de disolución de la enzima de papaína.

Una vez las muestras están descongeladas, se añaden 300 µL del buffer de papaína activado a cada muestra y se incuban *overnight* en una estufa a 60° C.

Para el segundo día, se deben preparar primero todas las soluciones que se van a emplear antes de sacar las muestras de la incubación:

1x TE buffer:

En función del volumen deseado, se añade un 5% del total del buffer 20x TE. El resto del volumen se añadirá de agua miliQ.

PicoGreen working reagent (PicoGreen WR):

Este reactivo es fotosensible, por lo que debe realizarse en condiciones de semioscuridad, o al menos, con la menor luz posible. Cuando se prepare, debe emplearse en unas pocas horas y el recipiente en el que se guarde hasta su uso irá recubierto de papel de aluminio.

Se añade el volumen que se desee de reactivo de 1x TE buffer. A ese volumen, se le quita con una micropipeta el 0,25% de ese volumen y se reemplaza por el stock de la disolución de PicoGreen.

Soluciones de ADN para la curva de calibrado:

Estas soluciones son 2, una de 40 µg/mL y otra de 2µg/mL. Se prepararán 100 µL de la primera y 40 de la segunda, ambos en eppendorfs de 0,5 mL. Para la de 40 µg/mL se cogerán 40 µL del stock de ADN concentrado a 100 µg/mL y se añadirán 60 µL del buffer 1x TE. Para la de 2 µg/mL se cogen 2 µL de la de 40 µg/mL y 38 µL del buffer 1x TE. Ambas soluciones se agitan empleando el vortex ms 3 basic IKA.

Estándares de ADN para la curva de calibrado:

A partir de las dos soluciones de ADN para la curva de calibrado, se preparan 8 estándares diferentes que serán los 8 puntos de la curva de calibrado. Para ello, se pipetea en diferentes eppendorfs los volúmenes que vemos en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición de los estándares para la curva del PicoGreen

	Volumen solución 2 µg/mL ADN (µL)	Volumen solución 40 µg/mL ADN (µL)	Volumen buffer de papaína activado (µL)
STD 0	0	0	40
STD 1	5	0	35

STD 2	10	0	30
STD 3	20	0	20
STD 4	0	5	35
STD 5	0	10	30
STD 6	0	15	25
STD 7	0	20	20

Una vez están listas las soluciones, se sacan las muestras de la incubadora y se procede con el ensayo. Se colocan 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de las muestras y los estándares en las placas p96 negras de forma que, por cada réplica biológica, haya 3 réplicas técnicas. Luego, se añaden 190  $\mu\text{L}$  del PicoGreen WR y se homogeneiza con la micropipeta.

Cuando se ha acabado con la placa multipocillo, se cubre con papel de aluminio durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras los 5 minutos, se coloca la placa en el lector y espectrofotómetro y se lee en excitación a 480 nm y en emisión a 520 nm.

Tras esto, se trabaja en Excel para obtener la cantidad de células por muestra, pero es necesario saber que la cantidad de ADN por célula de la línea de mieloma múltiple RPMI 8226 es de  $10,6 \pm 0,5$  pg (Marín-Payá, 2020)

## 7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

El resultado global del trabajo es el desarrollo de un entorno tridimensional en el que pueden cultivarse las MMC, para ensayar en estas el efecto de diferentes fármacos en el desarrollo del MM. El diseño de este modelo de enfermedad se basa en microesferas funcionalizadas que presentan a las células biomoléculas de su matriz extracelular. De esta forma se pretende que la respuesta celular pueda asemejarse a la que se produce *in vivo*. Las microesferas tienen por sí mismas un comportamiento de hidrogel, pero es el conjunto de microesferas dispersas en el medio líquido (microgel) el que tiene la movilidad que facilitará las interacciones entre las células tumorales y su entorno.

Se va a ver en primer lugar, la producción de las microesferas de alginato mediante microfluídica, comprobando cómo las condiciones del proceso determinan su tamaño. En estas microesferas las cadenas del polisacárido están entrecruzadas mediante enlaces iónicos, reversibles, lo que hace que sean inestables en distintos medios en los que los iones de calcio puedan desprenderse y difundirse fuera de la microesfera. Un primer estudio de estabilidad demuestra que la estabilidad no es suficiente en el medio de cultivo líquido y tampoco en varias de las disoluciones empleadas para la funcionalización. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido, pues, estabilizar las microesferas. El propio recubrimiento por multicapas de polielectrolitos, con el método de LBL, seguido o no de un entrecruzamiento químico de las moléculas de ese recubrimiento permitirá la obtención de microesferas suficientemente estables como para resistir 7 días en los medios donde las microesferas sin recubrir se desintegraban. De hecho, se consigue que la cápsula se mantenga tras sumergir las microesferas en un medio quelante del calcio (EDTA) que hace que el interior de alginato se licúe dando lugar a la microcápsula hueca. Esto nos da garantías de que los sistemas que desarrollamos de esta manera pueden utilizarse en cultivos celulares incluso en tiempos largos. Finalmente, se prueba el nuevo diseño de modelo de enfermedad que usa un biorreactor (agitador de tubos rotatorio Bio RS-24) en el que

se mantiene la suspensión de las células en el microgel. Para probarlo, se analiza la viabilidad y capacidad de proliferación celular en estas condiciones.

### 7.1. Microesferas de alginato (mo alginato)

Para la fabricación de las microesferas se emplea una disolución acuosa al 1% de alginato con 0,25M de carbonato cálcico disperso en ella. Se emplea así para lograr la reticulación interna del material, que pese a ser menos común que la externa, se observa que no deforma las microesferas. La idea seguida se basa en la del trabajo de Liu et al, 2013 (Liu et al., 2013), ya que por gelificación interna no se deforman las micropartículas al están en aceite hasta finalizar la reticulación (dentro y fuera del circuito, incluso en el baño ácido están en aceite). Mientras, en el de reticulación externa, las micropartículas pasan de aceite en el circuito a un baño acuoso de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , que provoca la deformación de las microesferas.

En primer lugar, se fabrican microesferas con el sistema de microfluídica variando los flujos de medio continuo y discontinuo. Una vez se encuentran flujos que permiten la obtención de microesferas de forma reproducible y estable, se observan en el microscopio óptico y se miden los tamaños con un software de análisis de imagen, ImageJ. Una vez realizadas las medidas, los tamaños de las microesferas en función de ambos flujos quedan recogidos en la Figura 17. En ella se ve cómo tanto el flujo del medio continuo como el flujo del medio discontinuo, tienen una influencia sobre el tamaño de las microesferas.

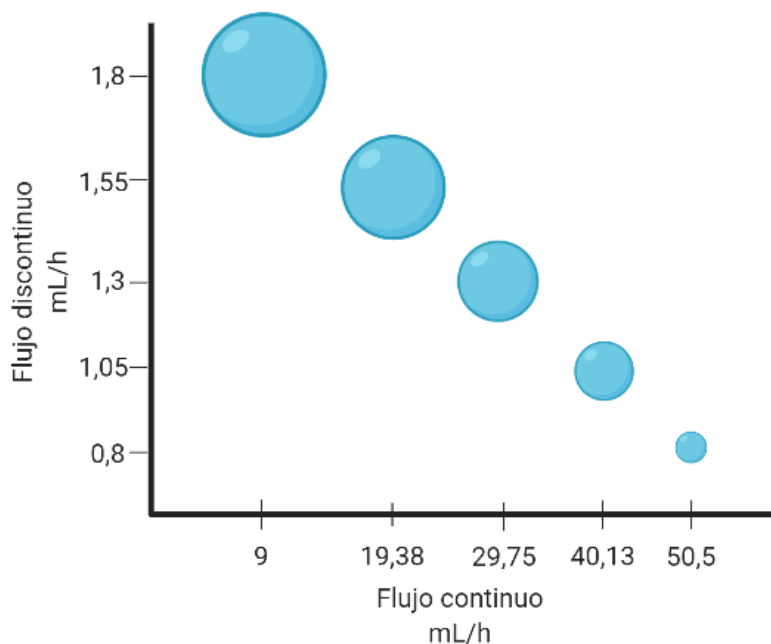


Figura 17. Tamaños de microesferas en función de los flujos continuo y discontinuo

Se observa que un mayor flujo continuo va a producir microesferas menores y un mayor flujo discontinuo va a hacer que el diámetro de estas sea mayor. Esto coincide con lo que se esperaba, ya que, si el medio continuo tiene un mayor flujo, la cantidad de fuerza que hace sobre el *jet* del medio discontinuo es mayor, por lo que logra romperlo más fácil y en trozos menores. Por otro lado, lo que sucede con el medio continuo también tiene sentido, ya que, si es mayor su flujo, la fuerza que ejerce el medio continuo sobre él no tiene tanto impacto y le permite generar

microesferas mayores. Esto es una característica de los sistemas *flow-focussing*, y una de las razones por las que las microesferas de alginato se fabrican por microfluídica en este trabajo (Anna et al., 2003).

Los valores de flujo escogidos responden a una solución de compromiso, pues si se necesitan las microesferas para sistemas de cultivo, es necesario que, en cada síntesis, la cantidad obtenida sea rentable. Como el flujo que condiciona la cantidad de microesferas obtenidas es el discontinuo (el de alginato), el mínimo rendimiento del sistema se escogió como 0,8 mL de microesferas por hora. Los rangos de tamaños tras medir las microesferas son:

Tabla 5. Rango de tamaños de las microesferas de alginato

Flujo medio continuo (mL/h)	Flujo medio discontinuo (mL/h)	Media mo ( $\mu\text{m}$ )	Desviación típica mo ( $\mu\text{m}$ )
9	1,8	274	22
19,38	1,55	177	27
29,75	1,3	139	28
40,13	1,05	115	24
50,5	0,8	72	10

La primera idea del trabajo era emplear en cultivo las microesferas más pequeñas, que se corresponden con el último par. Esta idea se propone debido a trabajos previos del grupo de investigación en los cuales, microesferas pequeñas conseguían aumentar la proliferación de las líneas celulares *in vitro* con respecto a la suspensión. Sin embargo, esto no fue posible porque al comenzar la síntesis, dependiendo del sistema empleado, los tamaños más pequeños sufrían variaciones en el diámetro relevantes y era difícil estabilizar el sistema. La hipótesis que se baraja es que las microesferas más pequeñas se obtuvieron poniendo al límite al sistema y por esto, no es tan reproducible y estable. Además de estar trabajando en el límite de las capacidades del sistema, existen ligeras diferencias entre los circuitos (si han quedado residuos dentro, si se ha despegado ligeramente, la viscosidad del lote de aceite empleado, si se pierde presión por algún punto...) que, junto con otros factores aun desconocidos, alteraban la obtención de microesferas, dificultando la obtención de suficientes microesferas que luego funcionalizar y emplear a ese tamaño. Por todo lo comentado, se decide que el tamaño puede ser mayor, y se fabrican microesferas empleando el segundo par de flujos, que, aunque sean mayores, son bastante más manejables, estables y su producción es más eficiente (Figura 18). Por lo tanto, los diámetros medios de las microesferas empleadas en este TFM serán de entorno a las 150-200  $\mu\text{m}$ .

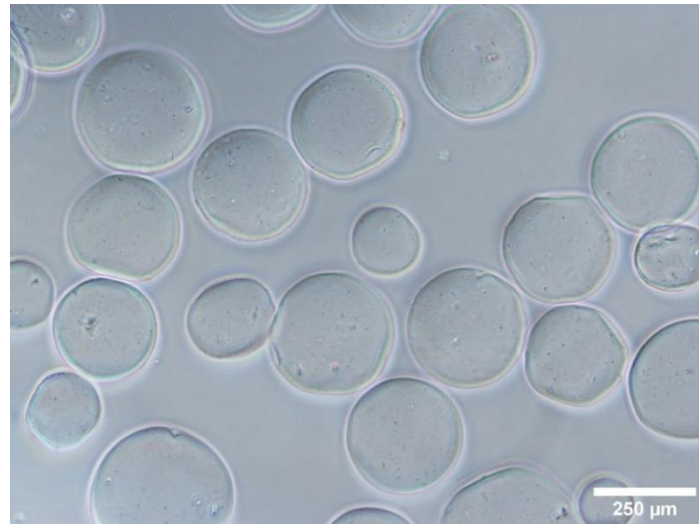


Figura 18. Microesferas de alginato sintetizadas con el montaje experimental explicado en el apartado de materiales y métodos y un flujo de medio continuo de 19,38 mL/h y 1,55 mL/h de discontinuo

Además, a lo largo del proyecto se detectó una carencia del sistema de producción. Al principio, la parte del tubo coaxial con aceite de bajo pH, que transporta las microesferas al colector no estaba (Figura 14). Esto hacía que las microesferas se reticularan al caer al colector, generando agregados difíciles o imposibles de separar, así como permitiendo la fusión de las microesferas de alginato y la reticulación de partículas bastante más dispersas de tamaños y formas (Figura 19 A). La idea de añadir el tubo que transportara las microesferas del sistema al colector y que en él se sumergieran en aceite con bajo pH (para lograr la reticulación previa a la deposición en el colector) fue del compañero Joaquín Rodenas Rochina, y permitió la casi completa eliminación de los agregados y fusiones (Figura 19.B).

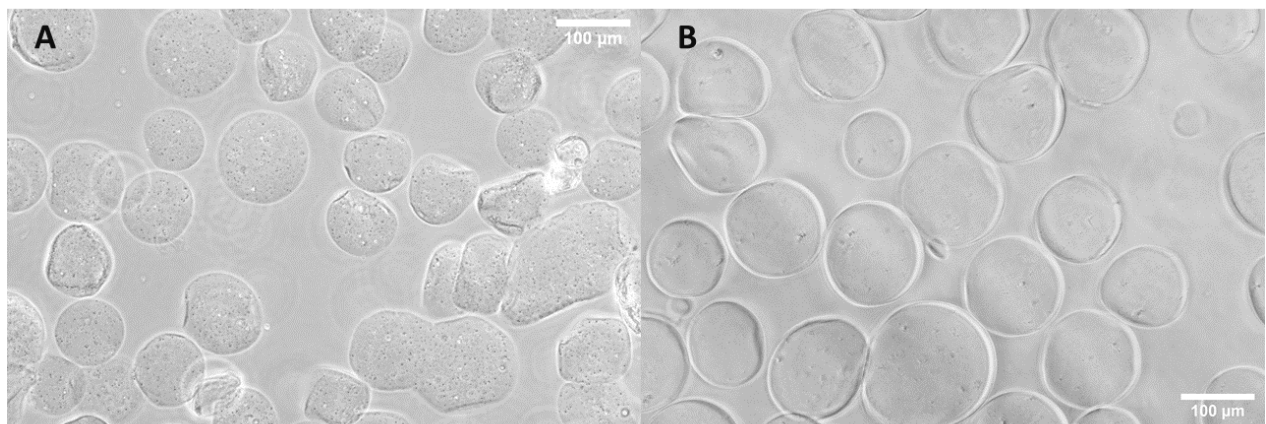


Figura 19. Microesferas de alginato obtenidas por microfluídica usando 50,5 mL/h en el medio continuo y 0,8 en el discontinuo A) sin tubo coaxial con bajo pH y B) con el tubo coaxial con bajo pH



Con el criofESEM se puede observar la cantidad de alginato que hay en la microesfera. Al congelar la muestra, los cristales de agua crecen, desplazando a las cadenas de alginato que reticulaban el interior y la superficie de la microesferas hasta la posición observada en las imágenes (Figura 20). La gran cantidad de poros y lo estrechas que son las trabéculas de la microesferas evidencian que la presencia de alginato era bastante baja (la concentración de síntesis es del 1%). También se observa la textura de la superficie, que es lisa.

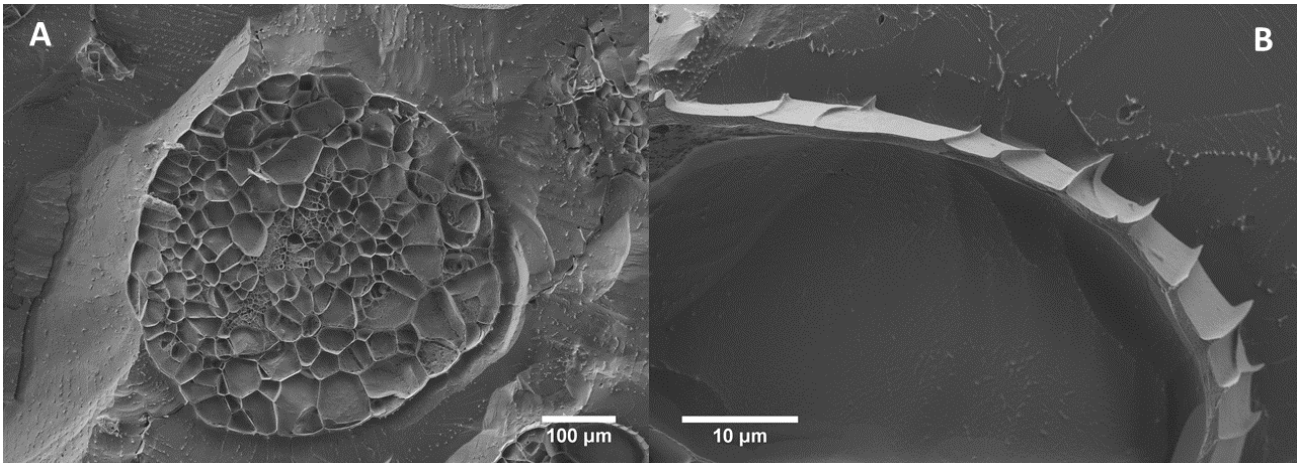


Figura 20. A) Imagen a 250 aumentos de una microesfera de alginato. B) Detalle a 2000 aumentos de la superficie de las microesferas de alginato

Una vez se conoce la microesfera por sí misma, es necesario conocer en que medios surgen problemas de resistencia. Con problemas de resistencia, se entiende que la integridad de la microesfera se vea comprometida o que incluso llegue a desaparecer. Se observan las microesferas tal como se ha explicado en materiales y métodos, y los resultados más destacables son:

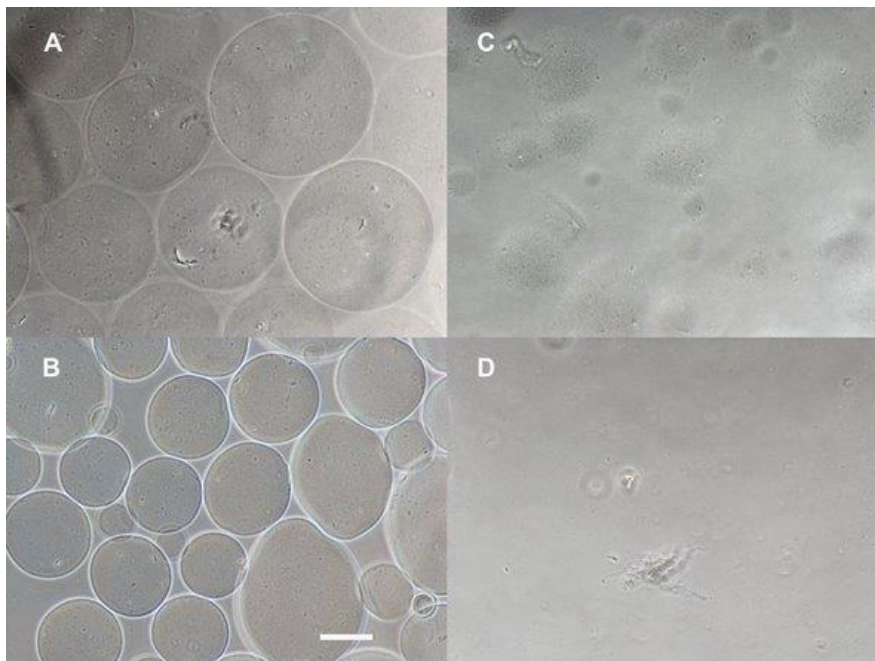


Figura 21. Microesferas de alginato tras 1h en los medios A) Agua Ph 7, B) Agua Ph 5,5 0,25 NaCl, C) EDTA, D) Alginato 1%p/v. Barra de dimensión de 100  $\mu$ m.

Lo primero que resulta llamativo es el cambio de tamaño en cada tipo de medio. Mientras que en el agua a pH 5,5 con sal (Figura 21 B) las microesferas se ven de unas 100-200  $\mu\text{m}$ , en el agua a pH 7 (Figura 21 A) no sucede lo mismo (se ven de más de 200  $\mu\text{m}$  todas). Mas allá del cambio de tamaño, las microesferas se mantienen estables en el agua por al menos 7 días.

Luego, si se observa la parte izquierda del panel, se puede detectar que las microesferas después de 1h en EDTA ya se han desintegrado. De hecho, lo que queda de ellas son como sombras y restos de lo que fueron al colocarlas en el pocillo (Figura 21 C). De igual forma, las microesferas han desaparecido también en la solución de alginato al 1% (Figura 21 D). Para tratar de comprender qué ha pasado en esta solución, debemos mirar primero el resto (Figura 22).

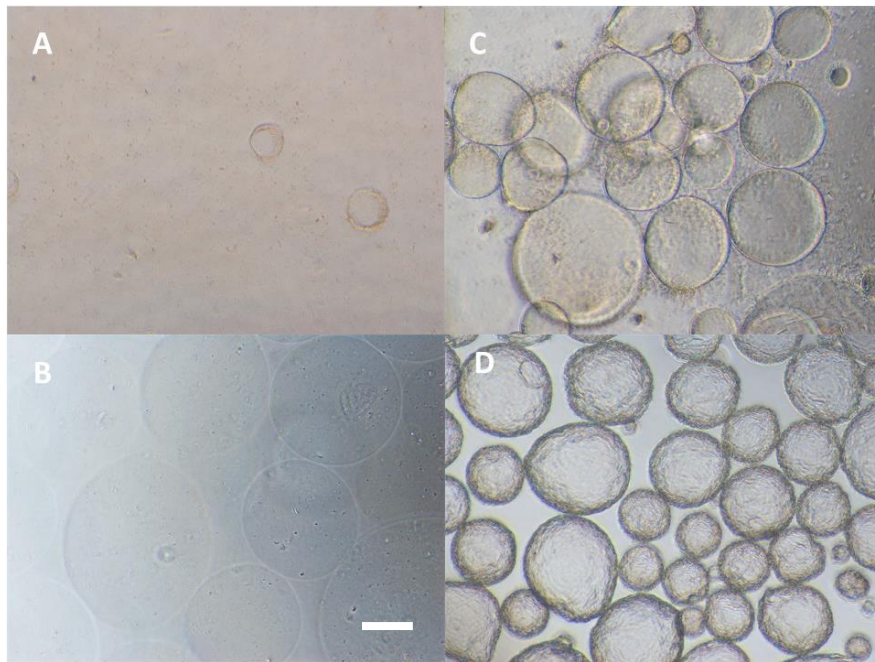


Figura 22. Microesferas de alginato tras 1 día A) RPMI 1640 y tras 7 días en B) Heparina 1% p/v 0,25 NaCl, C) Gelatina 1% p/v y D) PLL 1% p/v. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$

Podemos observar que la estabilidad de las microesferas en medio de cultivo no existe ya que tras un día ya han desaparecido prácticamente todas (Figura 22 A). Esto es un grave problema puesto que los cultivos deben durar al menos 5 días. Esta inconsistencia de las microesferas de alginato en el medio RPMI 1640 que hace imposible emplear estas microesferas en la plataforma, evidenciando aún más la falta que hace el recubrimiento. Luego, si nos fijamos en el resto de medios, a 7 días las microesferas en gelatina y PLL han ido muy bien y se ha mantenido estables. Por otro lado, aunque las microesferas en heparina han resistido los 7 días, se hinchan más (como como sucede con el agua a pH 7).

Para el quitosano se ha preparado una figura a parte (Figura 23) puesto que, aunque parece que se ha llegado a un límite de deposición en la superficie, con el paso de los días se han generado algunos residuos y agregados que comprometen la soltura de las microesferas.



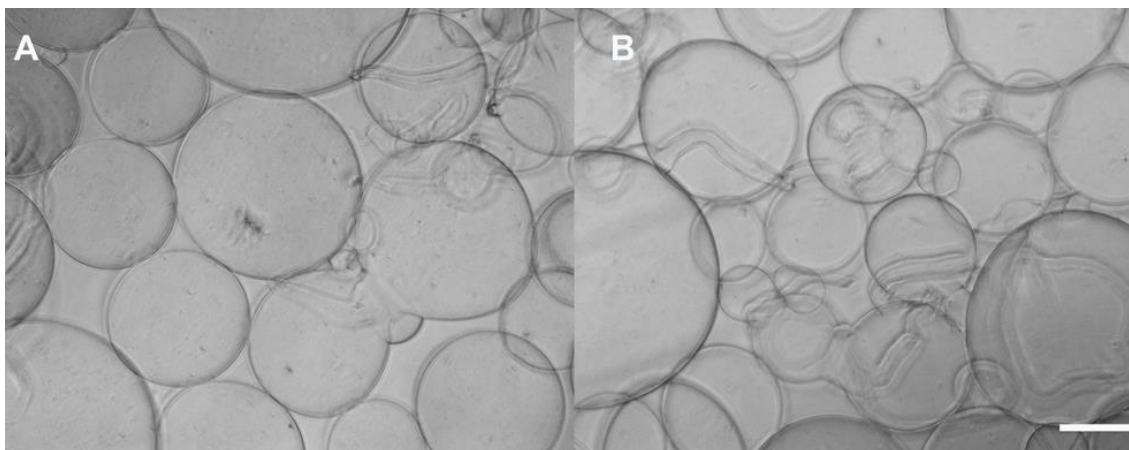


Figura 23. Microesferas de alginato tras A) 1h y B) 7 días en quitosano. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$

Por tanto, tras ver las imágenes del ensayo de resistencia se puede afirmar que en casi todos los medios de LBL, las microesferas no se deshacen. Puede que se debiliten y que de la manipulación luego no sea posible depositar muchas capas, pero con este ensayo no se puede obtener más información. De igual forma, parece que en función de la presión osmótica a la que se sometan las microesferas, cambiará el contenido de agua y por eso el volumen y tamaño son diferentes.

Otro descubrimiento es que las microesferas no son capaces de mantener su integridad en medio de cultivo RPMI 1640 ni en EDTA ni en Alginato al 1%. Estos resultados hacen necesaria la funcionalización de las microesferas, de tal forma que se obtengan las microcápsulas que vuelvan al microgel resistente al medio de cultivo. Sin una resistencia a 7 días, el cultivo no podrá realizarse.

La hipótesis que se propone para explicar por qué las microesferas se deterioran en unos medios y no en otros está basada en que el calcio sale de la microesfera para regular la concentración en el medio interno como en el externo de esta. El problema está cuando no hay recubrimientos que mantengan el ion ni la pompa y cuando no es posible añadir calcio a la disolución, como es el caso del alginato (Figura 21). No es posible añadirles calcio a todas las disoluciones porque en la de alginato, por ejemplo, se reticularía antes de usarla. Por tanto, una solución a los problemas de estabilidad de las microesferas con recubrimiento pasará por sustituir el alginato por algo que no capte tan rápido los iones calcio.

## 7.2. Microesferas de alginato con LBL de Gel-Alg-Gel (mo LBL GEL-ALG)

El recubrimiento se forma sumergiendo las muestras primero en la disolución de gelatina, después en alginato y de nuevo en gelatina. Luego se reticula el recubrimiento con glutaraldehído que une grupos amina presentes en la gelatina. Estas uniones se espera que se produzcan entre cadenas de la misma capa y entre las diferentes capas de gelatina. El resultado es que la microesfera presenta secuencias de adhesión por llevar la funcionalización de la gelatina en la capa más externa y se han reforzado con el recubrimiento entrecruzado covalentemente.

En los resultados se destaca cómo, con este tratamiento, las microesferas permanecen íntegras después de estar 7 días en EDTA (es decir con el interior completamente licuado ya que no tendrá iones de calcio). Lo mismo sucede al sumergirlas en el medio de cultivo, lo que las hace

aptas como microgel para los cultivos. También es muy interesante observar la capa en crioFESEM pues si se la compara con la microesfera de alginato sin recubrir (Figura 20 vs Figura 24) se ve cómo el interior de la microesfera con recubrimiento contiene un número menor de las trabéculas de alginato. Esto puede deberse a que en el paso en que las microesferas se sumergen en la disolución de Alginato para hacer el LBL se está alterando su estructura, favoreciendo la salida de iones calcio del interior. Esto explicaría por qué no se pudieron hacer más capas en este recubrimiento.

Con estos resultados y de cara al futuro, es interesante reforzar la microesfera de alginato antes de hacer un recubrimiento con el propio alginato (más adelante veremos que se ha conseguido hacerlo con PLL) o sustituir el alginato del recubrimiento por otro polianión.

Dentro de los resultados, en primer lugar, se observa la morfología de la microesfera:

Se realizan cortes transversales de las muestras de mo LBL Gel-Alg en el crioFESEM que permiten apreciar una pérdida de alginato en el interior de la microesfera con respecto a las de mo alginato (Figura 20 A vs Figura 24 A). Esto explicaría el aumento de la fragilidad de las microesferas, porque se puede comprobar que la concentración de alginato en el interior es menor a la que hay en las mo alginato por la menor cantidad de trabéculas. De igual forma, las imágenes nos muestran que el LBL no se puede observar en la superficie y que tampoco cambia el aspecto de la superficie con este tratamiento (Figura 24).

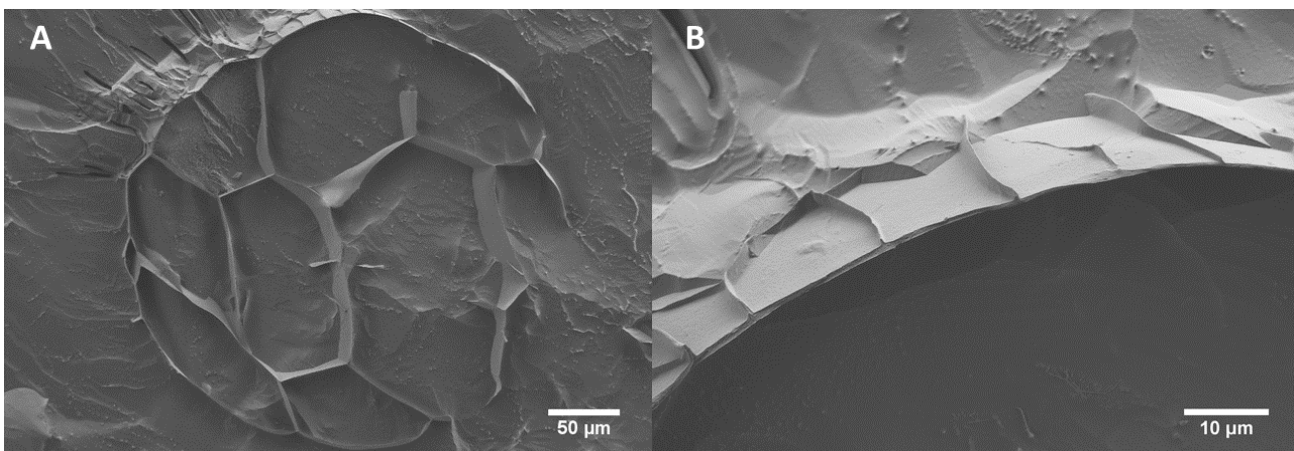


Figura 24. A) Microesfera LBL de Gel-Alg B) Detalle de la superficie de las microesferas de LBL de Gel-Alg

Antes de comentar el ensayo de estabilidad, se debe recordar que una de las razones por las que se propone el LBL es para conseguir estabilizar la microesfera de alginato en condiciones donde, de base, no es estable. Por tanto, lo primero que se va a comprobar es como ha afectado el LBL a la estabilidad de las microesferas en alginato 1%, medio de cultivo y EDTA:

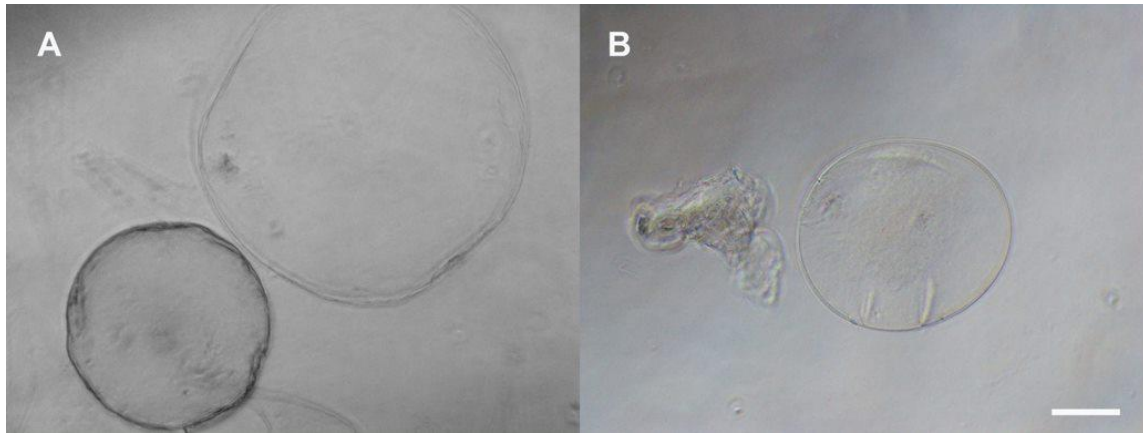


Figura 25. Microesferas LBL Gel-Alg tras 7 días en A) RPMI 1640 y B) EDTA. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$

Lo primero que se ve en la Figura 25 es como tras 7 días en medio de cultivo (25 A) las microesferas se han mantenido íntegras a excepción de unas ligeras deformaciones en la superficie (desniveles). En la 25 B se observa cómo en EDTA hay una microesfera que se ha conservado prácticamente perfecta tras 7 días y como otras se ha deshecho y ha acabado generando un cúmulo de materia. Estas imágenes representan lo que les ha pasado al resto, y es que se ha conseguido que la microesfera resista a los 7 días en medio de cultivo con este LBL por norma general y que en EDTA, la mitad de la población resista.

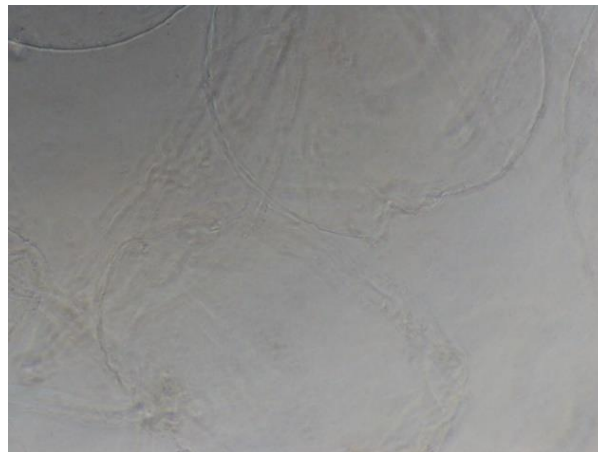
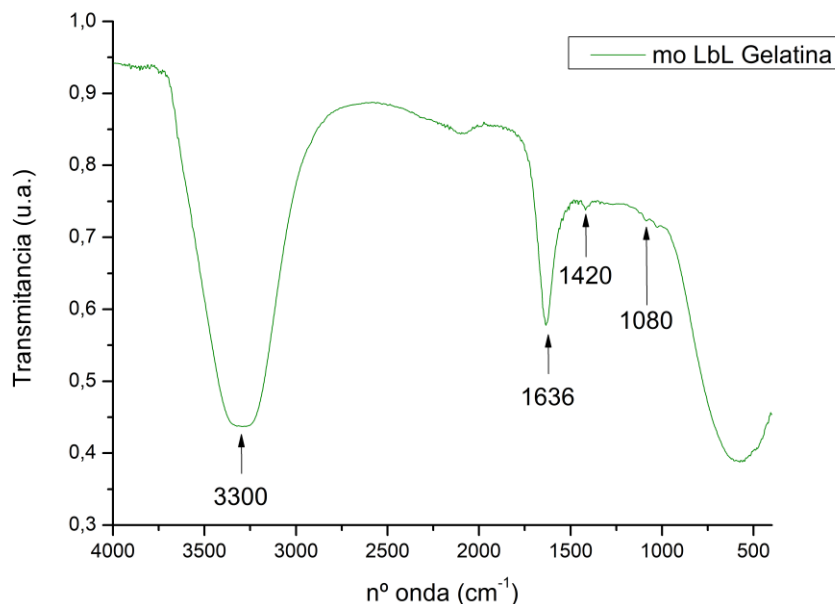


Figura 26. Microesferas LBL Gel-Alg-Gel tras 7 días en alginato 1%

En la Figura 26 se pueden ver los restos de microesferas tras 7 días sumergidas en alginato. Estos restos indican que la mayoría de las microesferas han explotado, puesto que, de lo contrario, si hubiera salido el material del interior, se habrían quedado arrugadas. Esto demuestra que sí puede haber algún problema que no se llega a comprender en el protocolo de funcionalización con la salida/entrada de alginato.

Mientras en el resto de las disoluciones probadas (Gelatina y agua a pH7), lo que se observa a 7 días es prácticamente lo mismo que es lo que había después de una hora y es la estabilidad y resistencia de las microesferas. Por tanto, aunque en EDTA y en alginato el recubrimiento no ha conseguido una estabilidad total de la microesfera, este sí es útil para poder emplear la microcápsula en cultivo celular basado en medio de cultivo RPMI 1640.

Para demostrar de forma definitiva que las microesferas están recubiertas de LBL, se realiza un ensayo de FTIR y TGA. En el primero, se ven picos característicos tanto del alginato como de la gelatina (Gráfica 1):

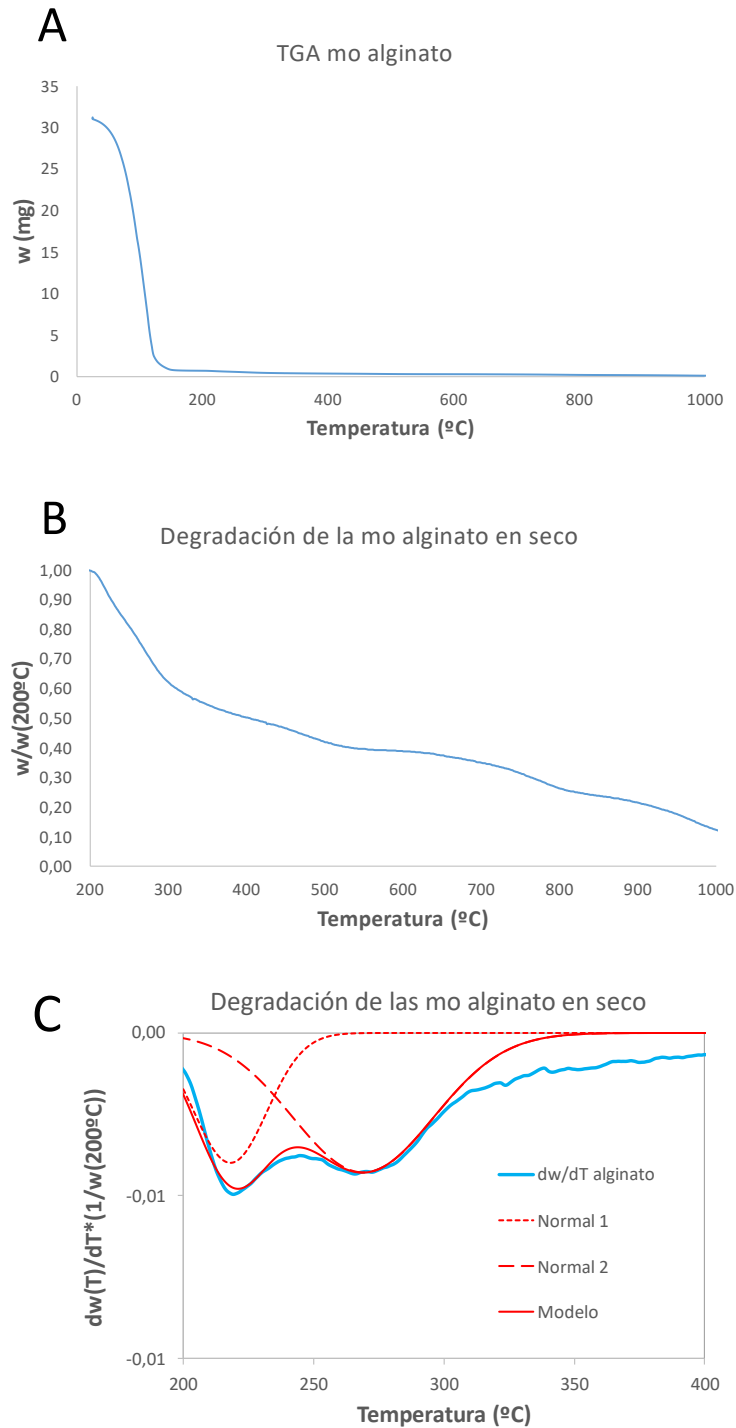


Gráfica 1. Espectro FTIR mo LbL Gel-Alg y sus picos característicos

Se destacan los picos de la imagen, porque se pueden relacionar con enlaces claves e ambos materiales. El primero de los picos es el de 3300 cm<sup>-1</sup> que es el de los enlaces OH, relacionados con el agua y los alcoholes. El pico de 1636 cm<sup>-1</sup> se corresponde con el grupo amida I (N-H), característico de la gelatina y que no está presente en el alginato. En el 1420 cm<sup>-1</sup> tenemos la vibración de los grupos carbohidrato, presentes en ambos materiales y el pico de 1080 cm<sup>-1</sup> es relativo a las cetonas o grupos carbonilos, presentes en ambos tipos de biomoléculas también (Kędzierska-Matysek et al., n.d.; Salaheldin et al., 2017).

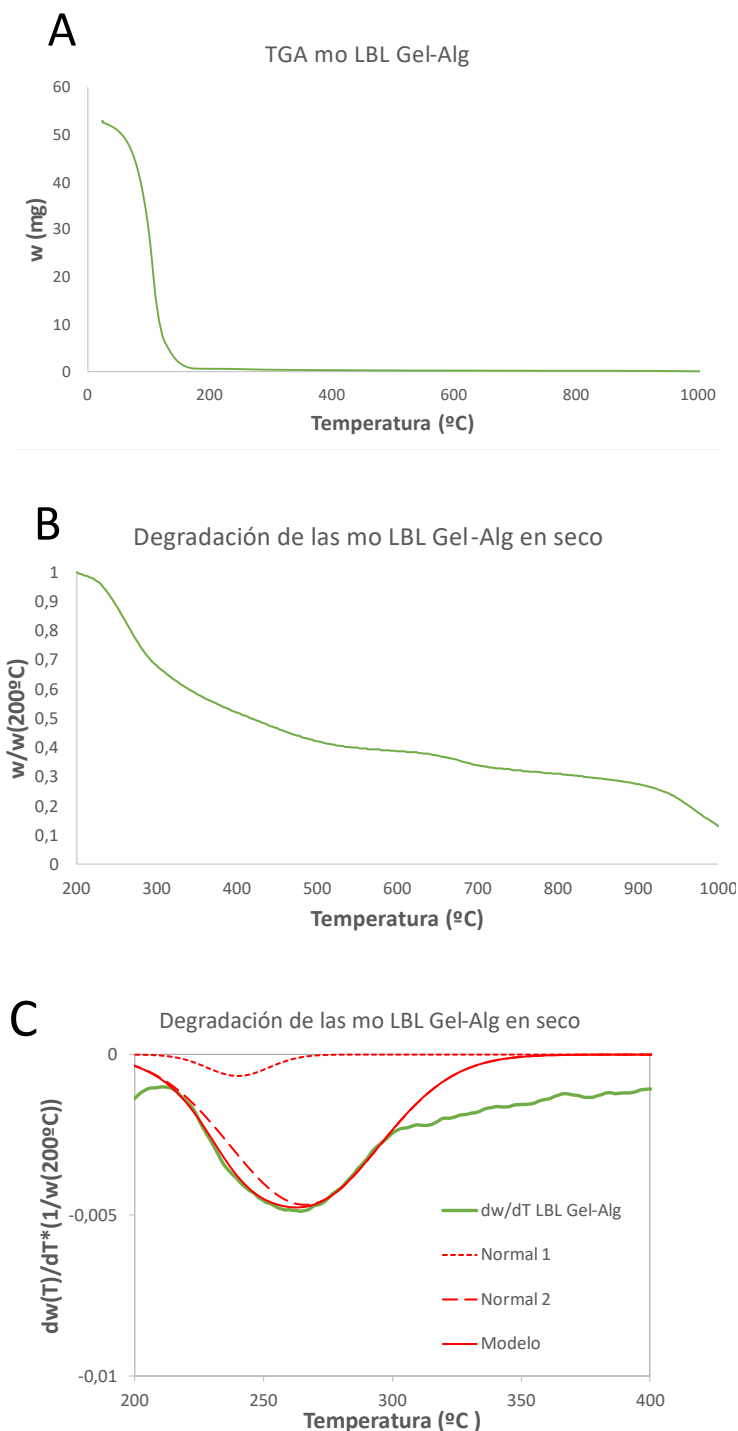
En el TGA se compara la degradación vista en las microesferas de alginato sin recubrir con la observada en las recubiertas con el LBL Gel-Alg y se tiene que:

En primer lugar, en la Gráfica 2 A se observa la evolución de la masa de las mo de alginato húmedas con el aumento de la temperatura. Es evidente que la gran caída de peso de las muestras es en el intervalo de 100-200 °C, lo que se corresponde con la evaporación del agua que contiene la microesfera, quedando a 200 °C, el peso seco del material de las microesferas. Este peso seco es el que se va a emplear para sacar conclusiones del ensayo de TGA. Además, se observa en la Gráfica 2 B que más de la mitad del peso en seco se pierde en el intervalo de 200 a 400 °C. En la Gráfica 2 C, se representa la derivada del peso normalizado por el peso en seco, que permite observar de forma más sencilla donde están las pérdidas de peso (los picos de la derivada se corresponden con las caídas del peso de la Gráfica 2 B). Se observa en la derivada que el peso se pierde en dos fases modelizables empleando la suma de dos curvas gaussianas. Una de las fases está centrada en 218°C y la otra en 269°C. La primera gaussiana parece corresponderse al pico de degradación característico del alginato, porque aparece en los demás recubrimientos también, pero con una menor intensidad.



Gráfica 2. A) Pérdida de peso de la mo alginato húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo alginato C) Derivada de la degradación del peso en seco de las mo de alginato

Comparando las curvas de las mo alginato con las funcionalizadas con el LBL Gel-Alg, se observa que:



Gráfica 3. A) Pérdida de peso de la mo LBL Gel-Alg húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL Gel-Alg C) Derivada de la degradación del peso de las mo LBL Gel-Alg por TGA

En la Gráfica 3 A se observa que la mayor pérdida del peso se da en las microesferas antes de los 200°C igual que en la Gráfica 2 A. Eso tiene lógica puesto que al igual que las microesferas de alginato, contienen un elevado porcentaje de agua. En la Gráfica 3 B se observa la caída del peso normalizado al peso en seco, y a simple vista se detectan curvaturas diferentes si se compara con la Gráfica 2 B. Si se observa la derivada (Gráfica 3 C) se ven esas ligeras diferencias de una forma mucho más clara. De hecho, cuando se prepara el modelo de la suma de las

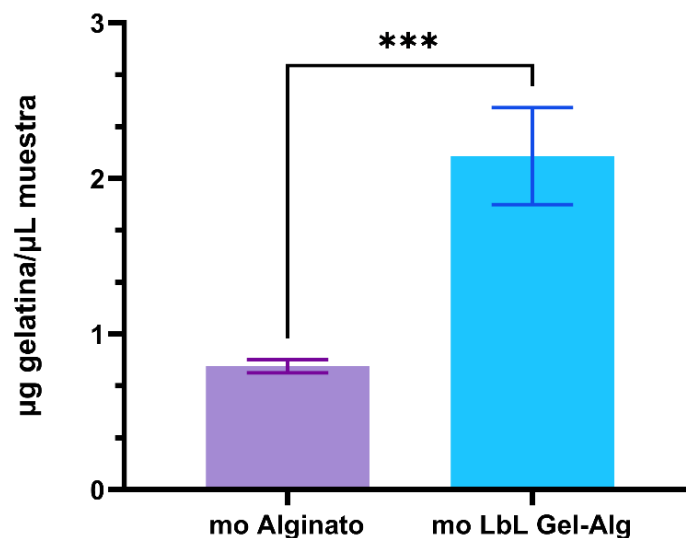
funciones normales, los picos de cada fase cambian. Cada fase a la degradación aporta de una forma diferente en el LBL a la degradación final.

La gelatina pura debe tener el pico de degradación térmica a temperaturas más altas que el alginato, porque el de baja temperatura está menos presente en el recubrimiento. Esto podría significar que la fracción de LBL es mayor de lo esperado, que tendría sentido porque la microesfera solo es un 1% de peso en alginato. No obstante, no se tienen los datos suficientes como para afirmar nada más.

Con los resultados observados hasta ahora se ha demostrado la existencia de un LBL que modifica las propiedades de la microesfera. Lo que falta ahora por determinar es la cantidad de gelatina que esté continua de forma cuantitativa mediante el BCA (Gráfica 4)

Se puede ver cómo las microesferas de alginato, que están compuestas por ningún tipo de proteína, nos dan algo de señal que se traduce en una concentración. Esto no tiene más relevancia ya que lo que se ha hecho ha sido comparar las microesferas mo LBL Gel-Alg con las microesferas sin recubrimiento (mo alginato). Se ha realizado la comparación para comprobar si hay diferencias estadísticamente significativas entre unas y otras. Como se ve con los 3 asteriscos de la figura, las diferencias son significativas con un P valor de 0,001. Esto nos permite decir que sí hay gelatina y que la concentración de esta es la que se ve en la Gráfica 4. Cuantificación por BCA de la proteína gelatina en las microesferas (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Por tanto, el recubrimiento, pese a ser solo de 3 capas, cumple su función de estabilizar a la microesfera en medios hostiles para estas y además, presenta gelatina a las células de forma efectiva.



Gráfica 4. Cuantificación por BCA de la proteína gelatina en las microesferas (\*\*\*)  $p < 0,001$



### 7.3. Microesferas de alginato con LBL de Chi-Hep 3 bicapas (mo LBL Chi-Hep)

La situación en el sistema LBL Chi-Hep es, en cierto modo, análoga al anterior. Se consiguen microesferas estables de hasta 3 bicapas y entrecruzarlas con EDC/NHS de forma exitosa, sin embargo, cuando se intentan depositar más capas cada vez se aglomeran más inutilizando las microesferas. Tras observar los resultados, es probablemente que esto tenga relación con la baja solubilidad del quitosano en agua a pH 5,5 que hace más difícil el proceso. No obstante, con 3 bicapas conseguimos presentar la heparina en la superficie de la microesfera durante el cultivo celular que es el objetivo. En crio-FESEM se aprecia con mucha claridad la capa de recubrimiento. Aunque no es posible medir el espesor de capa en las imágenes de crioFESEM, se ve claramente que es una capa submicrométrica y es llamativo que cuando se licúa el alginato en el interior de la microesfera con EDTA la forma de la microesfera se mantiene intacta.

La presencia de los materiales se comprueba de diferentes maneras: la del quitosano a través de su ligera autofluorescencia empleando el microscopio de fluorescencia (García-Cruz et al., 2012), la de la heparina se cuantifica a través del ensayo del Blyscan. También se emplea el FTIR para detectar los picos característicos de los componentes del recubrimiento, así como el TGA para demostrar la presencia del recubrimiento.

Con el crioFESEM se ha visto que la reticulación es aún más escasa que en los del otro LBL, como evidencia la Figura 27. Microesfera LBL Chi-Hep 3 bicapas Además, en esta misma imagen se evidencia algo que pasaba luego en otras microesferas de este tipo observado, que es que hay aglomerados de material que no se sabe que son a ciencia cierta. No obstante, la opinión de los técnicos del servicio de microscopía de la UPV es que podría ser suciedad o residuos que quedan por el método de trabajo, no parte del LBL.

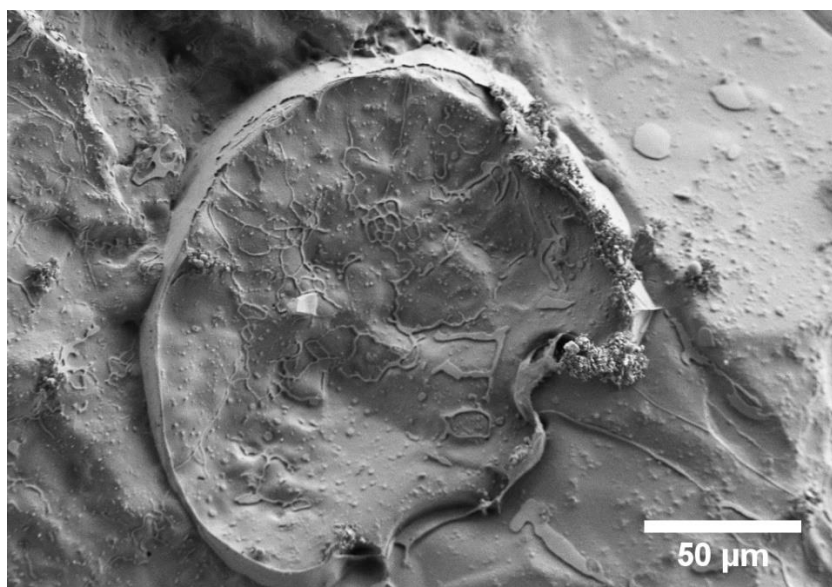


Figura 27. Microesfera LBL Chi-Hep 3 bicapas



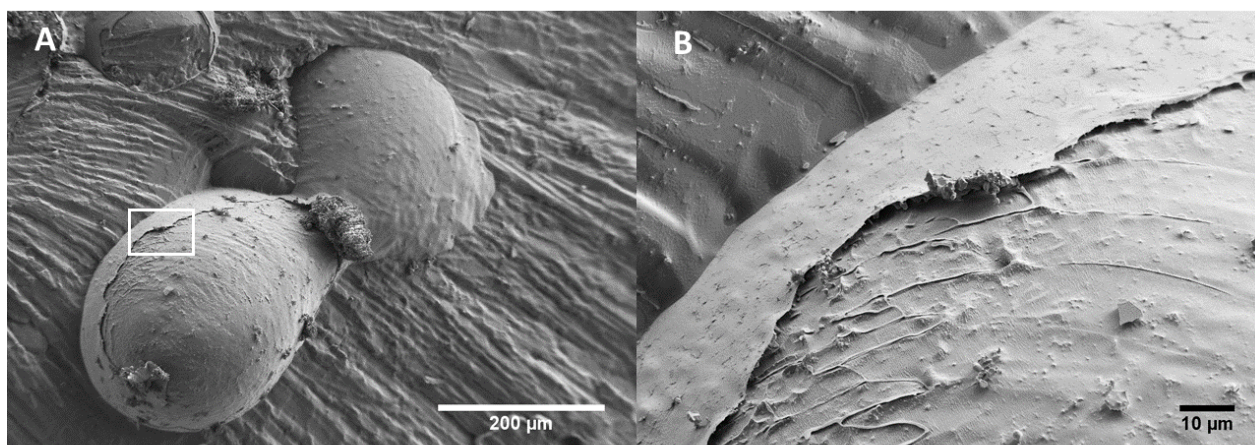


Figura 28. Imagen y detalle de dos microesferas con LBL Chi-Hep 3 bicapas. A) Visión de dos microesferas y B) detalle del recuadro de la imagen A

En la Figura 28 se ve como el recubrimiento es capaz de unir dos microesferas como sucede en la figura. De hecho, esta parte A se puede observar cómo se ha levantado una parte del LBL, lo que permite ver cómo es el interior de este, y las zonas de unión a la microesfera. En la imagen B se aprecia el detalle de la organización del LBL entre la capa final de la microesfera y la del LBL. Al no ser esta zona de la microesfera un elemento sólido, sino más bien poroso, se puede deducir que entre las capas hay agua o aire que se eliminan con el proceso (y dejan esos poros). Además, en este recubrimiento la superficie queda como con motas de material, lo que hace que se pueda diferenciar de otros tipos de microesferas.

Antes de comentar el ensayo de estabilidad, se debe destacar que una de las razones por las que se propone el LBL es para conseguir estabilizar la mo de alginato en condiciones donde, de base, no es estable. Por tanto, lo primero que vamos a comprobar es como ha afectado el LBL a la estabilidad de las microesferas en medio de cultivo y EDTA:

Lo primero que se va a comentar es como tras 7 días en medio de cultivo (Figura 29 B), las microesferas se han mantenido en casi su totalidad, pero con alguna ligera deformación. También se aprecia algo de suciedad en el medio de cultivo. En la figura A se observa cómo tras 7 días, se han conservado también perfectas en EDTA, incluso los elementos que nos sobran como fibras o aglomerados. Mientras que en el resto de disoluciones (Figura 29 C y D), lo que se observa a 7 días es prácticamente lo mismo que es lo que había después de una hora.

Pese a no saber si el interior de estas mo está licuado en el resto de disoluciones excepto en la de EDTA debido a las características del ensayo, si las microesferas resisten en EDTA durante 7 días, es posible tratarlas antes del cultivo y conseguir la microcápsula. En el resto de medios, no se puede saber si el interior está licuado, pero las microesferas resisten allí donde las mo alginato no lo hacen, y se pueden usar en cultivo.

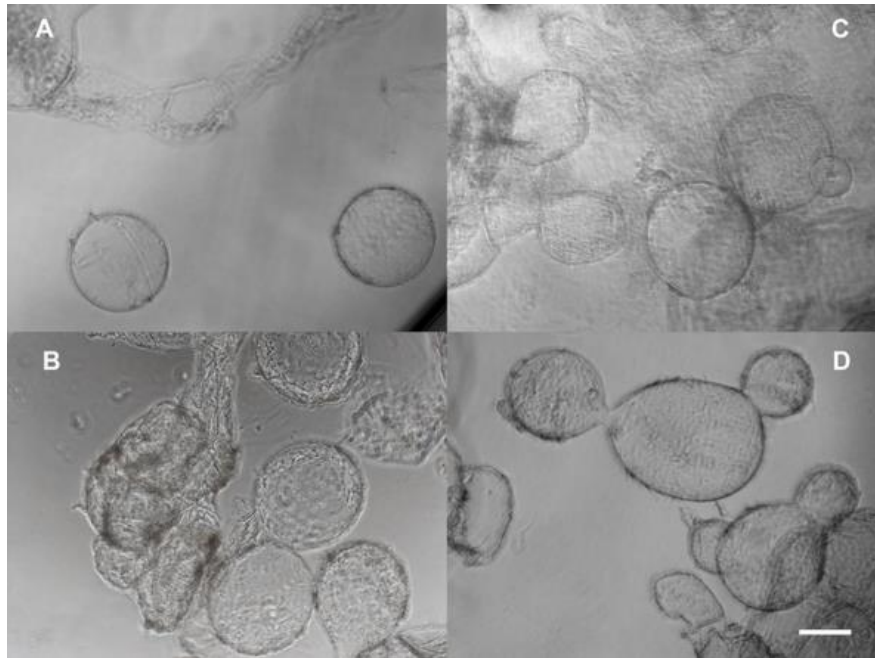
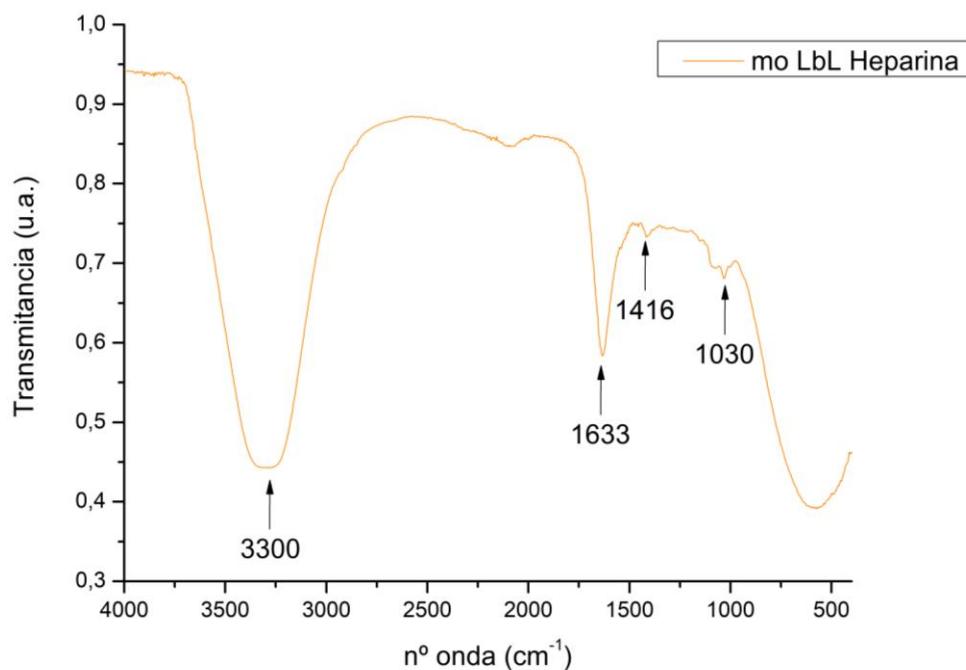


Figura 29. Microesferas LBL Chi-Hep 3B tras 7 días en A) EDTA , B) RPMI 1640 ,C) Quitosano, D) Heparina. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$

Sin embargo, se detecta una desventaja de este par con respecto al anterior, y es que parece que el uso de quitosano genera muchos aglomerados y residuos (Figura 29). Esto podría deberse a la alta interacción electrostática con el alginato, que dificulta su lavado en el proceso de LBL y acaba generando esos filamentos que no se desean.

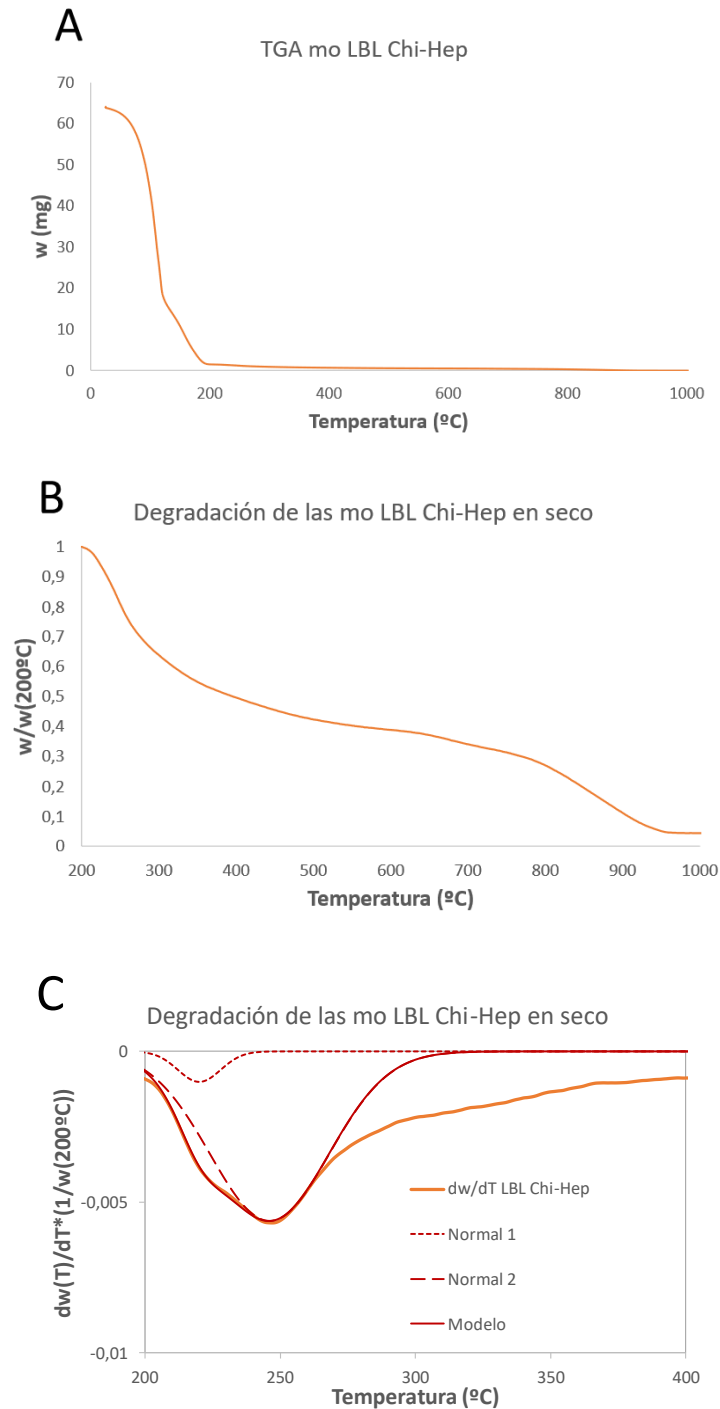
Para demostrar de forma definitiva que las microsferas están recubiertas de LBL, se realiza un ensayo de FTIR y TGA, en los que se ven:



Gráfica 5. Espectro FTIR mo LBL Chi-Hep y sus picos característicos

El pico que se obtiene en  $3300\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con los grupos alcoholes unidos a algún carbono. Luego el pico de  $1633\text{ cm}^{-1}$  se corresponde al C=N que se forma al entrecruzarse el quitosano (amina) con la heparina (carboxilo) (Sutirman et al., 2016). Finalmente, está el pico de  $1416\text{ cm}^{-1}$  que vuelve a ser de carbohidratos, pero el pico  $1030\text{ cm}^{-1}$  sí es característico de grupos S=O, típicos de la heparina.

En el TGA se observa que:



Gráfica 6. A) Pérdida de peso de la mo LBL Chi-Hep húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL Chi-Hep C) Derivada de la degradación del peso de las mo LBL Chi-Hep por TGA

Se puede volver a ver como el LBL cambia la degradación de la microesfera con la temperatura (igual que en el LBL Gel-Alg). En la Gráfica 6Gráfica 3 A se observa de nuevo la pérdida de casi toda la masa antes de los 200 °C debido al alto contenido en agua. En la Gráfica 6Gráfica 3 B se puede observar también si se compara con la Gráfica 2 B que las caídas son diferentes, y eso es debido a la presencia de este LBL. En la derivada (Gráfica 6 C) tampoco se vieron cosas demasiado concluyentes. Al igual que en las anteriores microesferas (mo LBL gel-alg) se vio que estaba la descomposición en dos fases de todo el constructo, con el ajuste de las dos gaussianas. De igual forma, la gaussiana de baja temperatura, que asociamos con el alginato puro (Gráfica 2 C), queda muy pequeña con respecto a la otra, lo que podría indicar que lo que se está degradando no es alginato únicamente, sino el LBL y que el porcentaje de masa del LBL con respecto al total de la microesfera en seco es elevado.

Luego, para el quitosano, la imagen de fluorescencia (Figura 30) de las microesferas funcionalizadas con quitosano nos dan señal principalmente en el canal azul. Se sabe que es por el quitosano porque ni el alginato ni la heparina son autofluorescentes. Además, se comprueba que las microesferas sin funcionalizar no consiguen dar señal autofluorescente

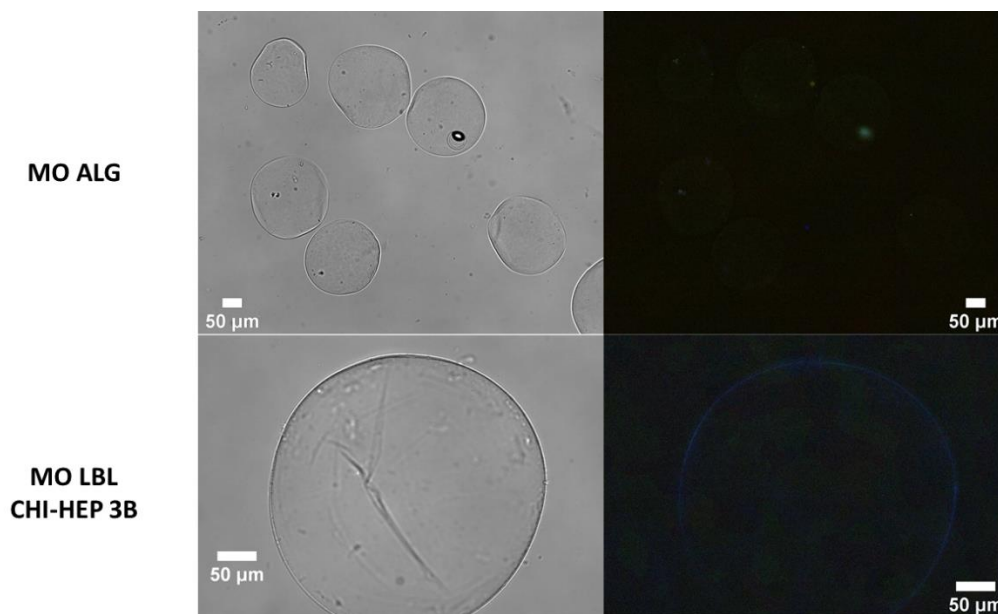
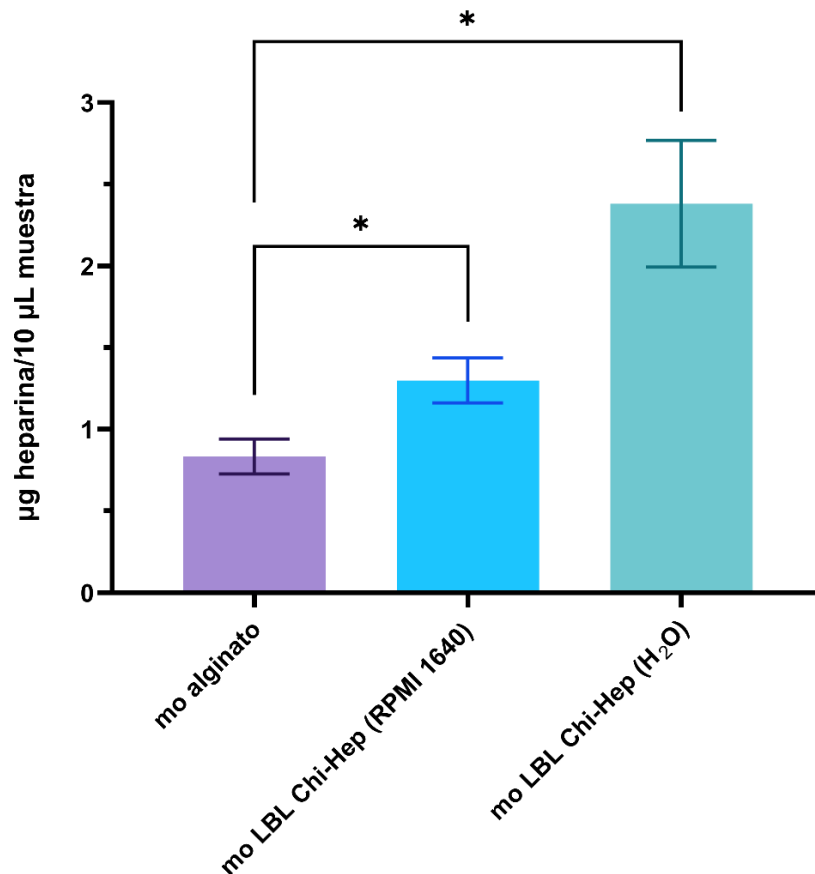


Figura 30. Microesferas de alginato y su autofluorescencia y microesferas LBL Chi-Hep 3B

Con los resultados observados hasta ahora se ha demostrado la existencia de un LBL que modifica las propiedades de la microesfera. Lo que falta ahora por demostrar es la presencia de quitosano y la de heparina. La de quitosano se observa empleando una imagen de fluorescencia mientras que la heparina, se puede cuantificar el Blyscan (Gráfica 7):



Gráfica 7. Resultados del Blyscan para cuantificar el GAG heparina

Se puede ver cómo las microesferas de alginato, que no contienen ningún tipo de GAG dan algo de señal que se traduce en una concentración. Esto no tiene más relevancia ya que lo que se ha hecho ha sido comparar las microesferas recubiertas con LBL Chi-Hep tras estar un tiempo en medio de cultivo y ese mismo tiempo, pero en agua con las microesferas sin recubrimiento. LA comparación entre microesferas con LBL y sin es lo relevante en este Blyscan

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las microesferas con LBL y sin él, lo que implica que el LBL de heparina es cuantificable y está ahí mientras que la señal de las mo alginato no es nada. Además, como no existen diferencias significativas entre estar en medio de cultivo o en agua durante un periodo de tiempo, la heparina no parece desprenderse del LBL y se sigue mostrando con el paso del tiempo.

No se especifica el p valor obtenido con el estadístico puesto que, como el tercer tipo de muestra no se sigue una distribución normal, se han comparado de formas diferentes. De hecho, las 2 normales (mo alginato y LBL Chi-Hep (RPMI 1640)) se han comparado con una ANOVA y estas dos normales con respecto a la no normal (LBL Chi-Hep en agua) empleando un estadístico no paramétrico (kurskall wallis).

#### 7.4. Microesferas de alginato con LBL de PLL-Alg 2 bicapas (mo LBL PLL-Alg)

Debido a los resultados anteriores, hemos buscado una forma de reforzar las microesferas antes de iniciar el proceso de recubrimiento por LBL y hemos tenido éxito simplemente depositando dos bicapas de PLL-Alg. Este par de polielectrolitos se ha utilizado con cierta frecuencia en la literatura, en particular se utilizó como forma de encapsular islotes pancreáticos para el tratamiento de la diabetes melitus, lo que se llamó biopáncreas artificial (Strand et al., 2002). Ciertamente la interacción entre el alginato y la PLL es muy fuerte y la construcción de estas dos bicapas acabadas en alginato, deja una microesfera estable sobre la que construir cualquier otro recubrimiento. Estas microesferas reforzadas son las que hemos empleado como control en los cultivos celulares. La caracterización de la presencia de PLL en la microesferas se ha hecho con FTIR, TGA y el análisis de ninhidrina

Si se observa la Figura 31 A se observa que la mayoría de microesferas están colapsadas o rotas en alginato tras 7 días. No obstante, en EDTA y RPMI 1640 (Figura 31 B y C) la mitad de las microesferas se han mantenido con la forma original y enteras, y la otra mitad solo han colapsado (se han arrugado), pero no se han reventado (roto).

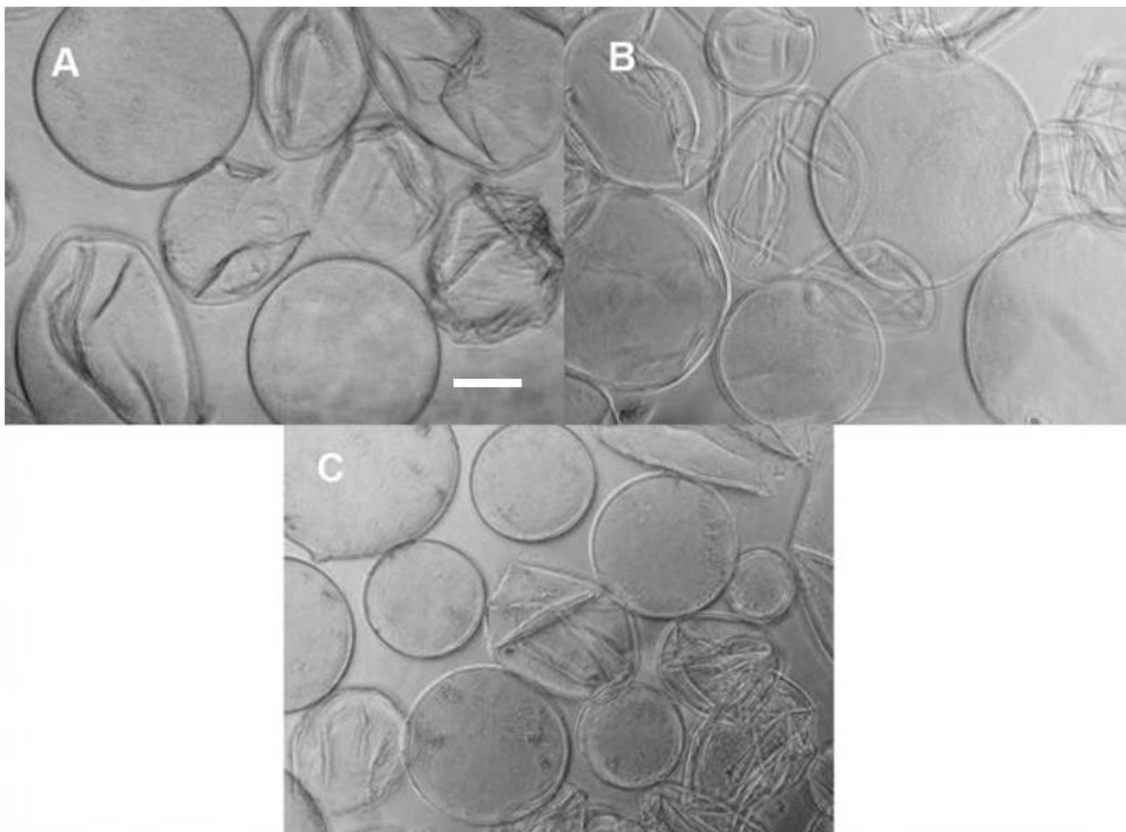


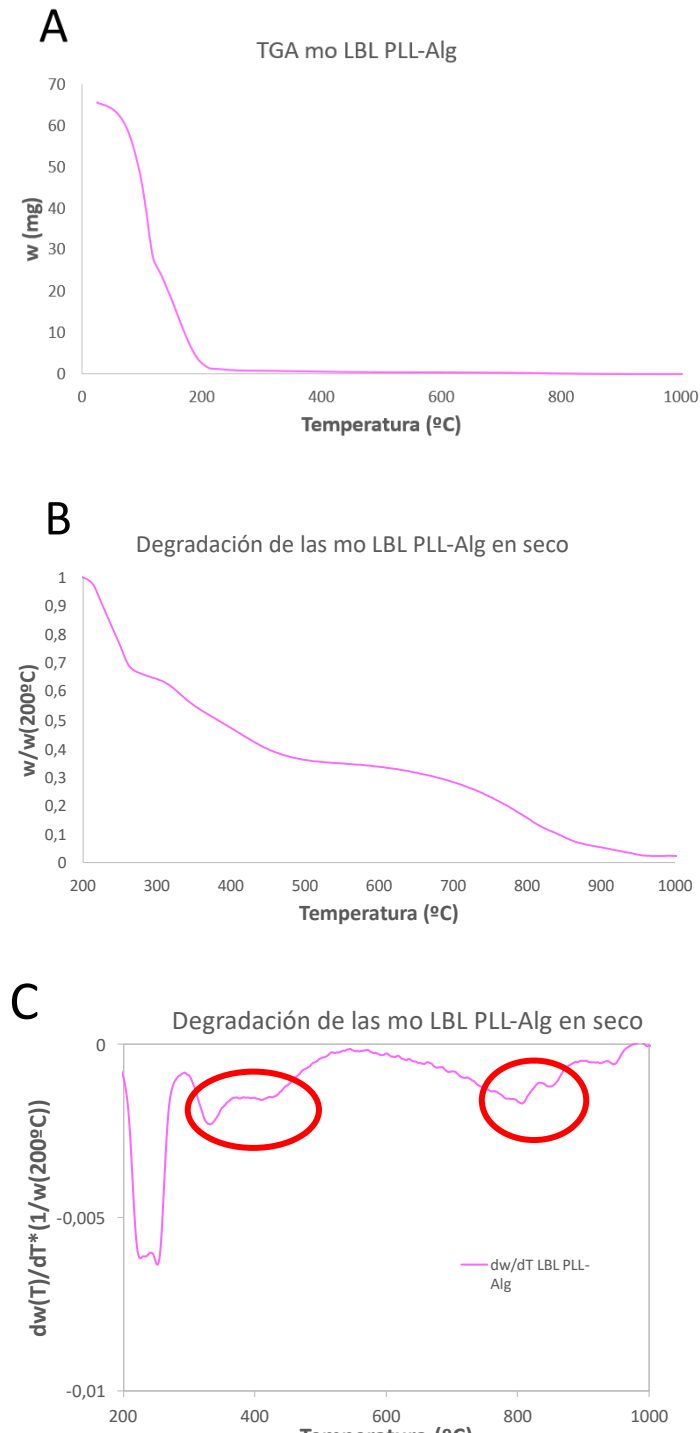
Figura 31. Microesferas de PLL-Alg 2 bicapas tras 7 días en A) alginato 1% B) RPMI 1640 C) EDTA. Barra de escala 100  $\mu$ m

Que las microesferas no hayan resistido al alginato podría explicarse por la falta de entrecruzamiento. Sin embargo, también sin entrecruzar, han resistido una semana en los medios más hostiles para las mo alginato. Por tanto, el recubrimiento de 2 bicapas de PLL-*alg* sin entrecruzar es una buena opción para las microesferas de la plataforma, e incluso podría emplearse como paso previo al LBL para poder construir más capas.



En el TGA, se observa que:

Tanto la pérdida de peso por la evaporación del agua inicial (Gráfica 8 A) como la pérdida de peso respecto al peso seco de la microsfera (Gráfica 8 B) son diferentes a las del alginato (Gráfica 2 A y B).

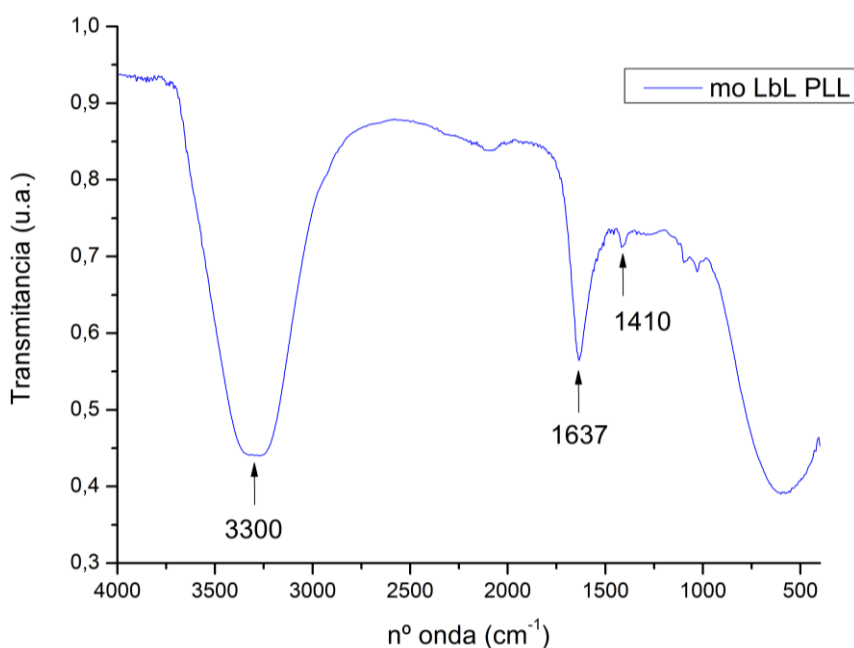


Gráfica 8. A) Pérdida de peso de la mo LBL PLL-Alg húmeda en el TGA B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las mo LBL PLL-Alg C) Evolución de la degradación de las mo LBL PLL-Alg por TGA

Si se observa la derivada del peso en seco, queda en evidencia la diferencia más significativa de la Gráfica 8 con respecto a la Gráfica 2, que es que abarca todo el rango de degradación en seco

(de 200 a 1000°C). El rango estudiado es más amplio en este recubrimiento porque, mientras que los demás materiales solo ofrecían caídas de peso (ya secadas las muestras) en el intervalo [200-400] °C, se podía analizar el recubrimiento solo observando en esa franja de temperatura. Este no es el caso de las mo LBL PLL-Alg. Como se ha remarcado en rojo, existen otras dos zonas de pérdida de peso (por eso la derivada tiene un pico) más allá de 400 °C. Esto significa que hay partes de la muestra que se degradan a esas temperaturas tan elevadas, lo que, a su vez, complica la extracción de cualquier conclusión. Por tanto, queda para un trabajo futuro preparar el material PLL puro y comprobar cómo es su curva del TGA (Como tenemos con el alginato de las mo alginato) y ver si se puede así extraer información.

También se realizó un ensayo de FTIR para comprobar si era posible detectar la existencia de picos característicos de la PLL en las muestras:

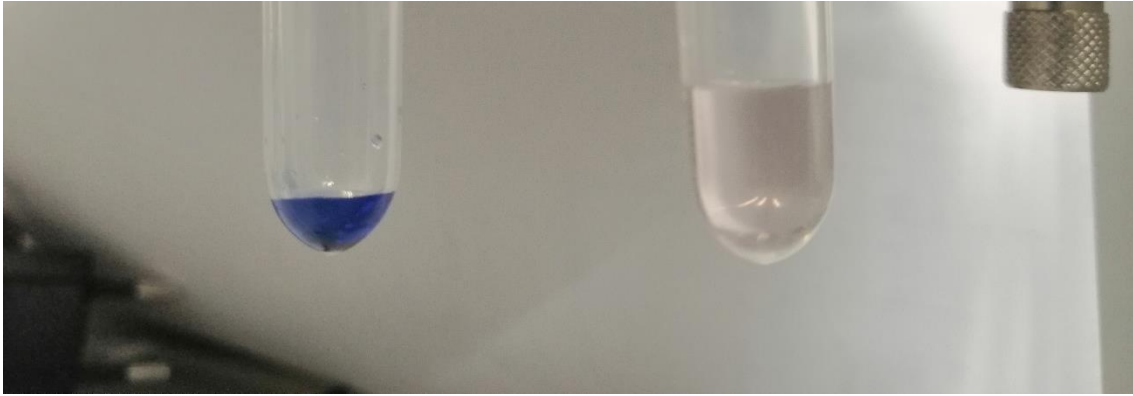


Gráfica 9. Espectro FTIR mo PLL-Alg y sus picos característicos

En este espectro se han marcado los picos que se corresponden con las longitudes de onda 3300, 1637 y 1410  $\text{cm}^{-1}$ . Estos picos se corresponden con los grupos alcohol (OH) unidos a biomoléculas mayores, a la amida tipo I y a enlaces O-H y C-H respectivamente. EL único que es característico de la PLL es el segundo, el de las amidas tipo I. Por tanto, hay PLL.

Finalmente, se tiene el ensayo de ninhidrina, que en un principio, se iba a cuantificar la presencia de PLL como se ha hecho con la heparina y la gelatina, pero no pudo hacerse. No obstante, si se pudo comprobar de forma cualitativa el resultado del ensayo de ninhidrina y con el demostrar la presencia de PLL (Figura 32). Las mo LBL PLL-Alg se han vuelto azules y el sobrenadante también, mientras que las mo de alginato no han sufrido dicha reacción. Esto es porque la ninhidrina se ha adherido a los grupos amina de la PLL, que no está presente en las microesferas de alginato, pero sí en el recubrimiento.





*Figura 32. Mo alginato (derecha) y mo LBL PLL-Alg (izquierda) tras el tratamiento con ninhidrina*

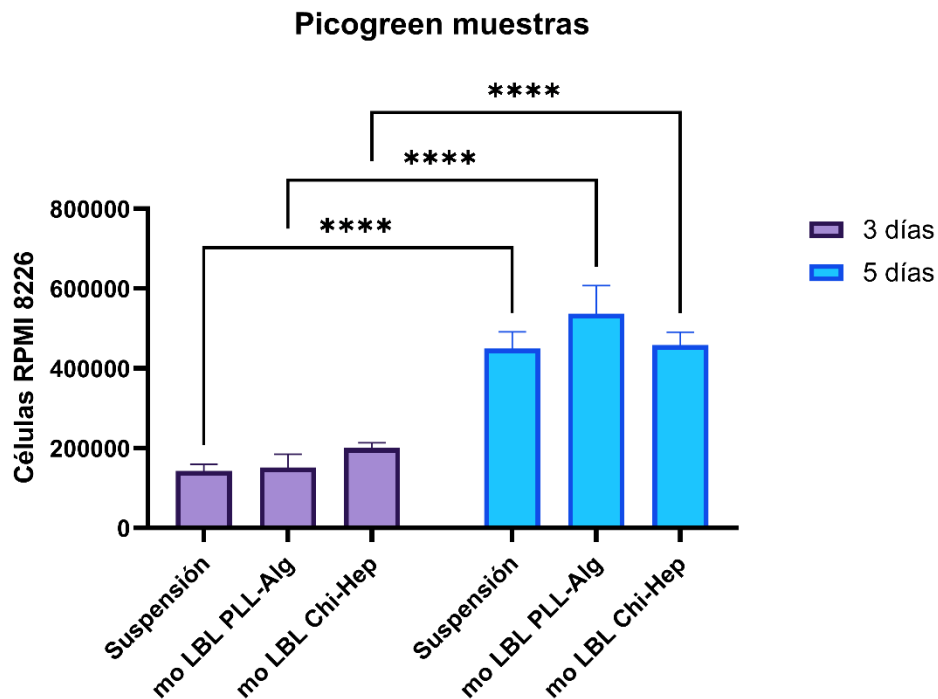
### 7.5. Cultivo células RPMI 8226

Este cultivo celular pretende poner a punto el sistema, demostrar que es viable y establecer las bases para trabajos futuros. No se pretende que el microgel aumente ni disminuya la proliferación de estas células, al menos de entrada, pese a que se haya empleado la heparina. Los resultados evidencian lo que se buscaba, que el nuevo modelo de enfermedad es viable y prometedor. De hecho, en el futuro será una buena plataforma en la que probar la generación de resistencia a fármacos de las MMCs en función de diferentes biomoléculas de interés e investigar qué rutas de señalización gobiernan estas resistencias. Otra de sus ventajas es la menor cantidad de células requeridas para realizar el cultivo, lo que permitirá avanzar en la personalización de los tratamientos de los pacientes (clínica).

La evaluación de la proliferación en la nueva plataforma de cultivo se realizó empleando un ensayo de PicoGreen a 3 y 5 días. Este ensayo permite la cuantificación de ADN de cada condición del cultivo de MMCs

Analizando los resultados de las diferentes condiciones (suspensión, mo LBL PLL-Alg como control y mo LBL Chi-Hep como material de interés) en la Gráfica 10 se observa que la población de 3 a 5 días se incrementa de forma estadísticamente significativa. Además, el uso de los diferentes microgeles no aporta nada al cultivo en suspensión en términos de proliferación (sin diferencias significativas entre los materiales y la suspensión en un mismo tiempo).

Se puede ver como en el microgel en suspensión se ha multiplicado casi por 10 la cantidad de células presentes, puesto que las condiciones iniciales del cultivo contemplaban 60000 células y tras 5 días hay unas 500000-600000. De igual forma, se puede observar como la principal parte de la proliferación se da entre el día 3 y el día 5, puesto que a día 3 la proliferación celular está en menos de 200000 células.



Gráfica 10. Gráfica resultados PicoGreen para los sobrenadantes a 3 y 5 días (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ )

Se quiso ver como interactuaban las microesferas con recubrimiento de heparina (mo LBL Chi-Hep) y las MMCs (RPI 8226) tras los 5 días de cultivo. Al observar la en el microscopio (Figura 33), no parece que las MMCs se hayan adherido a su superficie. Esta característica es interesante para el cultivo y co-cultivo futuros, pero debería comprobarse cuantitativamente esta no adhesión al biomaterial. Además, se puede apreciar en dicha figura que la microesfera ha resistido al cultivo con agitación constante durante 5 días, que era lo que se les pedía a las microcápsulas y lo que permitirá usarlas en cualquier cultivo futuro.

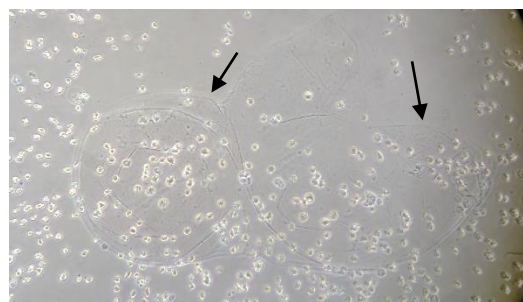
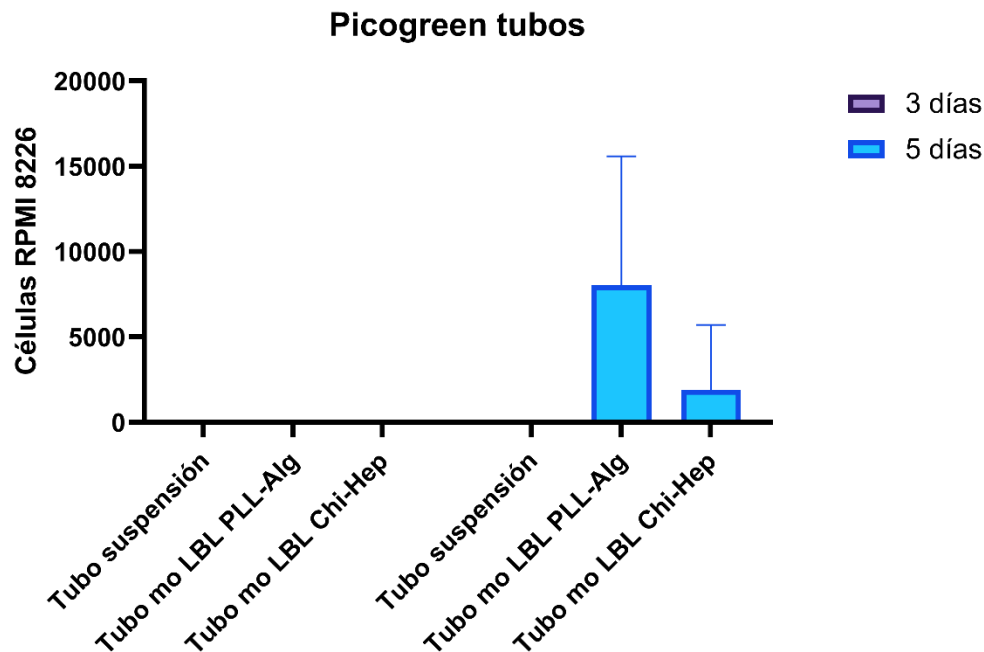


Figura 33. Imagen a 100 aumentos de las células interactuando con el microgel LBL

Para comprobar que los resultados de PicoGreen no son incorrectos porque hay MMCs que se hayan quedado en el criotubo, se realiza el mismo ensayo de PicoGreen a estos receptáculos (Gráfica 11). Si se comparan los valores de células obtenidos en ambos ensayos, todos ellos tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto a lo que contenía cada criotubo ( $P$  valor  $< 0,0001$  (\*\*\*\*)). Además, los resultados de la Gráfica 11 permiten afirmar que en los receptáculos no se quedan prácticamente células, y las que quedan pueden despreciarse.



Gráfica 11. Gráfica resultados PicoGreen para los tubos a 3 y 5 días

Por lo tanto, tras analizar los resultados de la proliferación celular se quiere poner en valor que tanto el cultivo como la plataforma han sido un éxito. Se califica como tal por parte de los autores ya que los materiales no han provocado ningún tipo de citotoxicidad y han resistido la agitación constante durante 5 días. Además, se ha logrado completar el cultivo en un volumen menor a lo habitual en el protocolo en placa de cultivo del grupo de investigación (200  $\mu$ L del tubo vs 500  $\mu$ L del pocillo) y con menos materiales. También, ha sido necesaria una menor fuerza mecánica para mantener la suspensión del cultivo. Todos estos resultados positivos permiten pensar en que esta plataforma pueda emplearse en células primarias de paciente en el futuro, cuya disponibilidad es menor, y ser usada en la clínica en un periodo corto de tiempo.

## 8. CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo se han desarrollado microesferas de alginato funcionalizadas con gelatina y heparina que se mantienen estables en el medio de cultivo utilizado en el modelo de enfermedad de mieloma múltiple.
- 2.- Tras licuar el alginato del interior de la microesfera se mantiene la forma de la microesfera, a pesar de que esta forma está sustentada sólo por una lámina submicrométrica formada por las capas del recubrimiento reticuladas químicamente.
- 3.- Se han llegado a producir por microfluídica microesferas con diámetro mínimo, en torno a las 50  $\mu$ m. Si se quisieran microesferas menores, habría que replantearse el sistema, centrándose en la reducción del tamaño los canales, puesto que parece que las microesferas más pequeñas se obtuvieron en el límite del sistema.
- 4.- Aunque la debilidad de las microesferas y la imposibilidad de añadir más de 3 capas a ninguno de los constructos podría deberse a la baja concentración de alginato en el interior de la

microcápsula, parece que el refuerzo con poli-L-lisina previo a depositar el resto de capas con las funcionalidades deseadas podría solucionar los problemas que aparecen.

5.- El recubrimiento de LBL se ha depositado correctamente y ha vuelto a las microesferas de alginato resistentes ante los medios en los que se deshacían (como el medio de cultivo o el EDTA a 7 días). Además, se ha logrado cuantificar la presencia de los materiales de interés en estas microcápsulas.

6.- La plataforma de cultivo ha logrado mantener las células en suspensión y que proliferen. De igual forma, los materiales no han interferido en esta proliferación de forma ni positiva ni negativa.

7.- Para estudiar el efecto de los materiales en el cultivo, en el futuro se realizarán co-cultivos de otros tipos celulares presentes en la médula ósea, replicando así más fidedignamente la matriz extracelular.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Abril Díaz, N., Antonio Bárcena Ruiz, J., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdés, F., & Túnez Fiñana, I. (n.d.). *8. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.*

Agarwal, A., & Ghobrial, I. M. (2013). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and Smoldering Multiple Myeloma: A review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification and management of myeloma precursor disease. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(5), 985. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2922>

Algieri, 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>

Alvarado-Ibarra, M., Luis Álvarez-Vera, J., Anaya-Cuéllar, I., de La Peña-Celaya, A., García-Fernández, L., Hernández-Ruiz, E., Herrera-Olivares, W., Leyto-Cruz, F., Loera-Fragoso, S. J., Martínez-Ríos, A., Medina-Coral, J. E., Mojica-Balceras, L., De, J., Morales-Adrián, J., Palafox-Zaldívar, M. T., Pérez-Zúñiga, J. M., Ramírez-Moreno, E. F., Ramos-León, E. M., Reyes-Brena, G. N., ... Tapia-Enríquez, A. L. (2015). Primer Consenso Nacional de Mieloma Múltiple por Hematólogos del ISSSTE. In *artículo EspEcial Rev Hematol Mex* (Vol. 16).

Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, 4(2), 133. <https://doi.org/10.3390/MICROARRAYS4020133>

Anna, S. L., Bontoux, N., & Stone, H. A. (2003). Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3), 364–366. <https://doi.org/10.1063/1.1537519>

Ayarza, J. (2014). Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. *Revista de Química PUCP*, 28(12), 379–395.

BCA Assay | Thermo Fisher Scientific . (n.d.). Retrieved July 4, 2021, from [https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?ef\\_id=CjwKCAjwIYCHBhAQEiwA4K21mwkAzNFXHwkI3qGVXpU8cK7JdPFvhcTh-cbP0mB2is-vs1B\\_o9Kw1hoCYCsQAvD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL13652!3!436793334953!p!!g!!bca%20assay&cid=](https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?ef_id=CjwKCAjwIYCHBhAQEiwA4K21mwkAzNFXHwkI3qGVXpU8cK7JdPFvhcTh-cbP0mB2is-vs1B_o9Kw1hoCYCsQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL13652!3!436793334953!p!!g!!bca%20assay&cid=)

bid\_pca\_sbu\_r01\_co\_cp1359\_pjt0000\_bid00000\_0se\_gaw\_nt\_pur\_con&gclid=CjwKCAjwIYCHBhA QEiwA4K21mwkAzNFXHwkl3qGVXpU8cK7JdPFvhcTh-cbPOmB2is-vs1B\_o9Kw1hoCYCsQAvD\_BwE

Biocolor company. (n.d.). *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay General Protocol*.

*Bone marrow | anatomy | Britannica*. (n.d.). Retrieved June 27, 2021, from <https://www.britannica.com/science/bone-marrow>

Caldwell, A. S., Aguado, B. A., & Anseth, K. S. (2020). Designing Microgels for Cell Culture and Controlled Assembly of Tissue Microenvironments. *Advanced Functional Materials*, 30(37), 1907670. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201907670>

Choe, G., Park, J., Park, H., & Lee, J. Y. (2018). Hydrogel Biomaterials for Stem Cell Microencapsulation. *Polymers 2018*, Vol. 10, Page 997, 10(9), 997. <https://doi.org/10.3390/POLYM10090997>

Clara-Trujillo, S., Gallego-Ferrer, G., & Gómez-Ribelles, J. L. (2020). In vitro modeling of non-solid tumors: How far can tissue engineering go? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms21165747>

contributors, M. M., & Firth, edited by J. (2019). Haematology: multiple myeloma. *Clinical Medicine*, 19(1), 58. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.19-1-58>

Correia, C. R., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2013). Multilayered hierarchical capsules providing cell adhesion sites. *Biomacromolecules*, 14(3), 743–751. <https://doi.org/10.1021/bm301833z>

*Crio-SEM | Microscopía Electrónica*. (n.d.). Retrieved July 4, 2021, from <https://micro.icm.csic.es/es/service/crio-sem>

Dingli, D., Ailawadhi, S., Bergsagel, P. L., Buadi, F. K., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Gertz, M. A., Gonsalves, W. I., Hayman, S. R., Kapoor, P., Kourelis, T., Kumar, S. K., Kyle, R. A., Lacy, M. Q., Leung, N., Lin, Y., Lust, J. A., Mikhael, J. R., Reeder, C. B., ... Khan, A. A. C. (2017). Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. In *Mayo Clinic proceedings* (Vol. 92, Issue 4, p. 578). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2017.01.003>

Equipo de la asociación americana contra el cancer. (2018, February 28). *¿Qué es el mieloma múltiple?* <https://www.cancer.org/es/cancer/mieloma-multiple/acerca/que-es-mieloma-multiple.html>

Equipo del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. (n.d.). *Esterilización > Generalidades*.

García-Cruz, D. M., Salmerón-Sánchez, M., & Gómez-Ribelles, J. L. (2012). Stirred flow bioreactor modulates chondrocyte growth and extracellular matrix biosynthesis in chitosan scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(9), 2330–2341. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.34174>

Gåserød, O., Sannes, A., & Skjåk-Bræk, G. (1999). Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*, 20(8), 773–783. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00230-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00230-0)

Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2019). *Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115514>

Hu, M., & Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2007.12.006>

Invitrogen. (2008). *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits*.

- Kędzierska-Matyssek, M., Matwijczuk, A., Florek, M., Barłowska, J., Wolanciuk, A., Matwijczuk, A., Chruściel, E., Walkowiak, R., Karcz, D., & Gładyszewska, B. (n.d.). *Application of FTIR spectroscopy for analysis of the quality of honey*. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181002008>
- 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>. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 8, Issue 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. In *Leukemia* (Vol. 23, Issue 1, pp. 3–9). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>
- Lazar-Karsten, P., Dorn, I., Meyer, G., Lindner, U., Driller, B., & Schlenke, P. (2011). The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythropoietic cell maturation. *Vox Sanguinis*, *101*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01453.x>
- Li, L., Wang, X., Li, D., Qin, J., Zhang, M., Wang, K., Zhao, J., & Zhang, L. (2020). LBL deposition of chitosan/heparin bilayers for improving biological ability and reducing infection of nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *154*, 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.152>
- Li, X., Tang, J., Bao, L., Chen, L., & Hong, F. F. (2017). Performance improvements of the BNC tubes from unique double-silicone-tube bioreactors by introducing chitosan and heparin for application as small-diameter artificial blood vessels. *Carbohydrate Polymers*, *178*, 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.120>
- Liu, L., Wu, F., Ju, X.-J., Xie, R., Wang, W., Niu, C. H., & Chu, L.-Y. (2013). Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, *404*, 85–90. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2013.04.044>
- Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I. M., & Roccaro, A. M. (2012). Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/157496>
- Marín-Payá, J. C. (2020). *3D CULTURE OF MULTIPLE MYELOMA CELL LINE USING MICROGEL ENVIRONMENTS*.
- McLarnon, A. (n.d.). *Bone Marrow | British Society for Immunology*. Retrieved June 27, 2021, from <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/organs-and-tissues/bone-marrow>
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., Andreeff, M., & Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. In *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>
- Newsom, J. P., Payne, K. A., & Krebs, M. D. (2019). Microgels: Modular, Tunable Constructs for Tissue Regeneration. *Acta Biomaterialia*, *88*, 32. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.02.011>
- Nisisako, T., Okushima, S., & Torii, T. (2005). Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. *Soft Matter*, *1*(1), 23–27. <https://doi.org/10.1039/B501972A>
- Nombela-Arrieta, C., & Manz, M. G. (2017). Quantification and three-dimensional microanatomical organization of the bone marrow. *Blood Advances*, *1*(6), 407–416. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016003194>

- Pasca, S., Tomuleasa, C., Teodorescu, P., Ghiaur, G., Dima, D., Moisoiu, V., Berce, C., Stefan, C., Ciechanover, A., & Einsele, H. (2019). KRAS/NRAS/BRAF Mutations as Potential Targets in Multiple Myeloma. *Frontiers in Oncology*, 9(OCT), 1137. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01137>
- Podar, K., Tai, Y. T., Hideshima, T., Vallet, S., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2009). Emerging therapies for multiple myeloma. In *Expert Opinion on Emerging Drugs* (Vol. 14, Issue 1, pp. 99–127). Expert Opin Emerg Drugs. <https://doi.org/10.1517/14728210802676278>
- Rajisha, K. R., Deepa, B., Pothan, L. A., & Thomas, S. (2011). Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites. In *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance* (pp. 241–274). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092281.2.241>
- Rana, D., Ramasamy, K., Leena, M., Jiménez, C., Campos, J., Ibarra, P., Haidar, Z. S., & Ramalingam, M. (2016). Surface functionalization of nanobiomaterials for application in stem cell culture, tissue engineering, and regenerative medicine. *Biotechnology Progress*, 32(3), 554–567. <https://doi.org/10.1002/BTPR.2262>
- Ratanavaraporn, J., Chuma, N., Kanokpanont, S., & Damrongsakkul, S. (2019). Beads fabricated from alginate, hyaluronic acid, and gelatin using ionic crosslinking and layer-by-layer coating techniques for controlled release of gentamicin. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(1). <https://doi.org/10.1002/app.46893>
- Reyes-Ortega, F., Rodríguez, G., Aguilar, M. R., García-Sanmartín, J., Martínez, A., & San Román, J. (2012). Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. In *Biomecánica, volumen 20* (Vol. 20, pp. 7–19). Universidad Politécnica de Catalunya.
- Rubino, S., Melin, P., Spellward, P., & Leifer, K. (2014). Cryo-electron microscopy specimen preparation by means of a focused ion beam. *Journal of Visualized Experiments*, 89. <https://doi.org/10.3791/51463>
- Ruoslahti, E. (1996). Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 697–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>
- Ryou, C., Titlow, W. B., Mays, C. E., Bae, Y., & Kim, S. (2011). The suppression of prion propagation using poly-L-lysine by targeting plasminogen that stimulates prion protein conversion. *Biomaterials*, 32(11), 3141–3149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.017>
- Sahoo, D. R., & Biswal, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/S42452-020-04096-W>
- Salaheldin, H. I., Negm, A., & Osman, G. E. H. (2017). Porcine skin gelatin–silver nanocomposites: synthesis, characterisation, cell cytotoxicity, and antibacterial properties. *IET Nanobiotechnology*, 11(8), 957–964. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0015>
- Schüler, J., Ewerth, D., Waldschmidt, J., Wäsch, R., & Engelhardt, M. (2013). Preclinical models of multiple myeloma: A critical appraisal. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.799131>
- Singhal, R., & Gupta, K. (2016). A Review: Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters). *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 55(1), 54–70. <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1050520>
- Strand, B. L., Gåserød, O., Kulseng, B., Espevik, T., & Skjåk-Baek, G. (2002). Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. *Journal of Microencapsulation*, 19(5), 615–630. <https://doi.org/10.1080/02652040210144243>
- Sutirman, Z. A., Sanagi, M. M., Abd Karim, K. J., & Wan Ibrahim, W. A. (2016). Preparation of methacrylamide-functionalized crosslinked chitosan by free radical polymerization for the removal

of lead ions. *Carbohydrate Polymers*, 151(June), 1091–1099.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.076>

*Tabla de coeficientes de amortización lineal.* - *Agencia Tributaria.* (n.d.). Retrieved May 17, 2020, from [https://www.agenciatributaria.es/AEAT.internet/Inicio/\\_Segmentos\\_/Empresas\\_y\\_profesionales/Empresas/Impuesto\\_sobre\\_Sociedades/Periodos\\_impositivos\\_a\\_partir\\_de\\_1\\_1\\_2015/Base\\_imponible/Amortizacion/Tabla\\_de\\_coeficientes\\_de\\_amortizacion\\_lineal\\_shtml](https://www.agenciatributaria.es/AEAT.internet/Inicio/_Segmentos_/Empresas_y_profesionales/Empresas/Impuesto_sobre_Sociedades/Periodos_impositivos_a_partir_de_1_1_2015/Base_imponible/Amortizacion/Tabla_de_coeficientes_de_amortizacion_lineal_shtml)

Vargas, M., González-Martínez, C., & Cháfer, A. (n.d.). *QUITOSANO: UNA ALTERNATIVA NATURAL Y SOSTENIBLE PARA LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS.*

Vincent, T., & Mechti, N. (2005). Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. In *Leukemia and Lymphoma* (Vol. 46, Issue 6, pp. 803–811).  
<https://doi.org/10.1080/10428190500051448>

Wikimedia Commons. (n.d.). *Chitosan chemical structural formula.svg.* Retrieved July 12, 2021, from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan\\_chemical\\_structural\\_formula.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_chemical_structural_formula.svg)

Wikipedia community. (n.d.). *Heparin.* Retrieved July 12, 2021, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>

Zlei, M., Egert, S., Wider, D., Ihorst, G., Wäsch, R., & Engelhardt, M. (2007). Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells. *Experimental Hematology*, 35(10), 1550–1561.  
<https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2007.06.016>



# **DOCUMENTO II: PRESUPUESTO**

## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1.	INTRODUCCIÓN .....	83
2.	CUADRO 1: MANO DE OBRA .....	83
3.	CUADRO 2: MATERIALES .....	84
4.	CUADRO 3: MAQUINARIA.....	86
5.	CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS .....	88
6.	PRESUPUESTOS PARCIALES .....	101
7.	PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL.....	103

## 1. INTRODUCCIÓN

En este segundo documento se muestran las cuentas generadas para obtener el presupuesto del proyecto y conocer su viabilidad económica. Los capítulos que lo componen se corresponden con los apartados de “materiales y métodos” del primer documento del TFM. Los recursos se han clasificado en función de si se clasifican como materiales, mano de obra, equipos de protección individual (EPIs) o maquinaria empleada, con los códigos que se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Códigos de los elementos del presupuesto

Código	Descripción
MO.	Mano de obra
MAT.	Materiales
MAQ.	Maquinaria
EPI.	Equipos de protección individual

Para redactar el presupuesto, se han generado 3 cuadros (materiales, mano de obra y maquinaria), en los cuales se han introducido los recursos empleados en el trabajo teniendo en cuenta su naturaleza. Tras estos, se ha generado el cuadro de precios descompuestos y el presupuesto parcial. Con el presupuesto parcial se ha calculado el presupuesto de ejecución material, por contrata y por último el presupuesto general.

## 2. CUADRO 1: MANO DE OBRA

En la siguiente tabla se exponen los costes de los diferentes profesionales que han trabajado en el presente proyecto. Pese a que se ha considerado a la autora del documento como ingeniera biomédica, no ha recibido ninguna retribución económica por su trabajo.

Tabla 2. Cuadro de mano de obra

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio (€)	Precio total (€)
1	MO.1	Horas	Estudiante del máster de ingeniería biomédica	324,25	15	4.863,75
2	MO.2	Horas	Tutores responsables del proyecto	35	45	1.575,00
3	MO.3	Horas	Técnico de laboratorio	114	20	2.280,00
<b>Precio total de la mano de obra</b>						<b>7.054,00</b>

### 3. CUADRO 2: MATERIALES

En la siguiente tabla se muestran los costes de los diferentes materiales empleados para realizar el trabajo experimental del presente TFM.

Tabla 3. Cuadro de materiales

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio (€)	Precio total (€)
1	EPI.01	ud	Bata de laboratorio	2,00	22,50	45,00
2	EPI.02	ud	Caja de guantes de latex (100 uds)	2,00	5,85	11,70
3	EPI.03	ud	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	2,00	7,95	15,90
4	EPI.04	ud	Máscara para partículas	1,00	7,35	7,35
5	EPI.05	ud	Máscara para gases	1,00	30,60	30,60
6	EPI.06	ud	Visera de protección facial	1,00	8,50	8,50
7	MAT.01	g	Alginato de sodio	2,42	0,46	1,12
8	MAT.02	g	Carbonato cálcico (CaCO <sub>3</sub> )	5,00	0,03	0,13
9	MAT.03	L	Aceite de Oliva	2,00	3,10	6,20
10	MAT.04	g	Lecitina de soja	20,00	0,21	4,26
11	MAT.05	mL	Ácido acético glacial	43,20	0,04	1,85
12	MAT.06	L	Cloroformo	1,00	85,50	85,50
13	MAT.07	g	Gelatina tipo A	0,28	0,43	0,12
14	MAT.08	g	Glicina	0,08	0,12	0,01
15	MAT.09	mL	Glutaraldehido 25%	0,32	0,39	0,12
16	MAT.10	mg	N-hidroxisuccinimida (NHS)	208,00	0,01	2,08
17	MAT.11	mg	N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC)	600,00	0,05	31,53
18	MAT.12	g	Quitosano	0,28	1,70	0,48
19	MAT.13	g	Heparina	0,28	1,00	0,28
20	MAT.14	mg	Poli-L-Lisina (PLL)	130,00	2,50	325,00
21	MAT.15	mL	Ácido clorhídrico (HCl)	0,70	0,42	0,29
22	MAT.16	mL	Hidróxido de sodio (NaOH)	2,90	0,40	1,16
23	MAT.17	g	Cloruro de sodio (NaCl)	23,75	0,04	0,88
24	MAT.18	ud	Tamiz pluriselect 60 µm de poro	6,00	2,42	14,52
25	MAT.19	ud	Acople vacío falcon 50 mL	3,00	-	-
26	MAT.20	ud	Pipeta Pasteur	20,00	0,20	4,00
27	MAT.21	L	Agua miliQ	12,00	0,20	2,40
28	MAT.22	L	Agua destilada	4,00	0,20	0,80
29	MAT.23	ud	Kit B1000 Blyscan	0,10	290,00	29,00

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

30	MAT.24	ud	Kit análisis proteico BCA (Thermofisher)	0,10	236,55	23,66
31	MAT.25	g	Acetato de litio dihidrato	4,08	0,25	1,02
32	MAT.26	g	Ninhidrina	0,80	3,06	2,45
33	MAT.27	g	Hidrindantina	0,12	4,54	0,54
34	MAT.28	g	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	15,00	1,21	18,15
35	MAT.29	L	Etanol 98%	0,53	3,95	2,09
36	MAT.30	mL	Suero fetal bovino (FBS)	15,00	0,38	5,70
37	MAT.31	ud	Flascon cultivo T25	1,00	1,45	1,45
38	MAT.32	vial	Células mieloma múltiple (RPMI 8226)	2,00	738,50	1.477,00
39	MAT.33	mL	RPMI 1640 Media (Gibco)	581,00	0,47	273,07
40	MAT.34	mL	L-glutamina	2,00	0,21	0,42
41	MAT.35	mL	Penicilina-estreptomicina	2,00	0,27	0,54
42	MAT.36	g	Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	20,00	0,22	4,40
43	MAT.37	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,70	0,14	0,10
44	MAT.38	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,70	0,11	0,08
45	MAT.39	g	Hidrocloreuro de l-cisteína hidratado	0,06	0,50	0,03
46	MAT.40	mg	Solución papaína	5,00	2,48	12,40
47	MAT.41	ud	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit	0,10	812,00	81,20
48	MAT.42	ud	Placa multipocillo p96 transparente	3,00	2,92	8,76
49	MAT.43	ud	Placa multipocillo p96 negra	3,00	3,10	9,30
50	MAT.44	ud	Vaso precipitados 50 mL	10,00	3,29	32,90
51	MAT.45	ud	Placa cultivo p96-estéril	4,00	1,39	5,56
52	MAT.46	ud	Micropipeta 1000 µL (Themo)	1,00	215,00	215,00
53	MAT.47	ud	Micropipeta 200 µL (Themo)	1,00	215,00	215,00
54	MAT.48	ud	Micropipeta 20 µL (Themo)	1,00	215,00	215,00
55	MAT.49	ud	Pipeta electrónica "easypet3" (Eppendorf)	1,00	466,00	466,00
56	MAT.50	ud	Punta pipeta 25 mL	10,00	0,47	4,70
57	MAT.51	ud	Puntas micropipeta 100-1000 µL	250,00	0,03	7,50
58	MAT.52	ud	Puntas micropipeta 2-200 µL	110,00	0,04	4,40
59	MAT.53	ud	Eppendorf 1,5 mL	100,00	0,07	7,00
60	MAT.54	ud	criotubos rosca 2 mL	28,00	0,42	11,72
61	MAT.55	ud	Tubos falcon 50 mL	30,00	0,12	3,60
62	MAT.56	ud	Tubos falcon 15 mL	15,00	0,10	1,50
63	MAT.57	ud	Pinzas laboratorio	1,00	8,99	8,99

64	MAT.58	ud	Espátula metálica laboratorio	2,00	3,99	7,98
65	MAT.59	ud	Espátula teflón laboratorio	1,00	1,99	1,99
66	MAT.60	ud	Frasco 50 mL	6,00	3,65	21,90
67	MAT.61	ud	Vaso precipitados 3 L	1,00	5,83	5,83
68	MAT.62	ud	Portaobjetos	10,00	0,22	2,17
69	MAT.63	m	Papel de aluminio	1,00	0,11	0,11
70	MAT.64	ud	Jeringuilla 6 mL	10,00	0,74	7,40
71	MAT.65	ud	Aguja para microfluídica	6,00	0,40	2,40
72	MAT.66	m	Tubo elástico para microfluídica	1,20	0,75	0,90
73	MAT.67	ud	Tamiz con tamaño de poro de 40 µm	40,00	0,57	22,80
74	MAT.68	ud	Bolsas zip	10,00	0,12	1,20
75	MAT.69	ud	Jeringuillas 50 mL	10,00	0,83	8,30
76	MAT.70	ud	Tubos 1,5 mL con tapa de rosca	28,00	0,17	4,69
77	MAT.71	ud	Tubos eppendorf de 2 mL	100,00	0,03	2,52
78	MAT.72	ud	Pinceles silicona	2,00	8,30	16,60
79	MAT.73	mL	Etilenglicol	40,00	0,08	3,20
<b>Total materiales (€)</b>						<b>3.858,80</b>

#### 4. CUADRO 3: MAQUINARIA

Para conocer el coste/ud de cada equipo utilizado, es necesario aplicar la amortización. Esta permite revalorizar cada máquina en función del tiempo utilizada y la vida útil que aun le queda. Debido a la naturaleza electrónica de la mayoría de los aparatos empleados, se selecciona como periodo de amortización (Pa) los 10 años que establece la Agencia Tributaria española para equipos electrónicos (*Tabla de Coeficientes de Amortización Lineal. - Agencia Tributaria, n.d.*).

En la siguiente tabla se ha estimado el coste de cada equipo mediante la amortización de los equipos (A) siguiendo la ecuación (I). La ecuación consta del coste del equipo (C), periodo amortizado (Pa) y el tiempo que se ha utilizado el equipo (T<sub>uso</sub>).

$$A = \frac{C \cdot T_{uso}}{P_a}$$

Tabla 4. Cuadro de maquinaria

nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio (€)	Precio total (€)
1	MAQ.01	Horas	Balanza de precisión con pantalla de la marca Mettler Toledo, modelo XS104	17,00	0,29	4,95

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

2	MAQ.02	Horas	Balanza de precisión Entris 2202i-1S SARTORIUS	5,00	0,19	0,95
3	MAQ.03	Horas	Agitador magnético OVAN miniMix	42,00	0,20	8,40
4	MAQ.04	Horas	Agitador magnético con temperatura AM4 de VELP SCIENTIFICA	19,00	0,35	6,65
5	MAQ.05	Horas	PSU-2T mini agitador para inmunología Biosan	237,50	0,81	191,68
6	MAQ.06	Horas	NE 1000 higher pressure programmable single syringe pump	120,00	0,34	41,10
7	MAQ.07	Horas	Standard PHD ULTRA™ CP Syringe Pump	120,00	0,49	58,22
8	MAQ.08	Horas	Vitrina de extracción de gases VA Valles Flores	126,00	2,14	269,69
10	MAQ.10	Horas	Bañera de ultrasonidos	5,00	0,05	0,27
11	MAQ.11	Horas	Servicio de microscopia crioFESEM UPV	4,00	30,00	120,00
12	MAQ.12	Horas	Espectrofotómetro ALPHA FT-IR (Bruker)	1,00	4,28	4,28
13	MAQ.13	Horas	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	0,60	3,63	2,18
14	MAQ.14	Horas	Incubadora CO2 Thermo Fisher Scientific VIOS 160i	204,00	2,12	431,99
15	MAQ.15	Horas	Baño térmico Digiterm 200P SELECTA	0,50	0,02	0,01
16	MAQ.16	Horas	Pie de rey electrónico	3,00	0,01	0,03
17	MAQ.17	Horas	Microscopio óptico invertido Eclipse TS100 con cámara Nikon integrada	5,50	3,44	18,90
18	MAQ.18	Horas	Microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse 80i	4,00	2,48	9,91
19	MAQ.19	Horas	TGA/DSC 2 de Mettler Toledo	12,00	5,14	61,64
20	MAQ.20	Horas	PH-metro de sobremesa PH50 marca Violab	20,50	0,23	4,68
21	MAQ.21	Horas	Neubauer	1,00	0,01	0,01
22	MAQ.22	Horas	Campana de flujo laminar Faster TWO30	18,00	0,17	3,06
23	MAQ.23	Horas	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	1,75	2,49	4,37
24	MAQ.24	Horas	Autoclave MOCOM extrema-prima-proxima	0,50	0,15	0,07

25	MAQ.25	Horas	Congelador	72,00	0,63	45,36
26	MAQ.26	Horas	Baño termostático BAE 04 (Raypar)	5,25	0,45	2,36
27	MAQ.27	Horas	Agitador de tubos rotatorio Bio RS-24 Biosan	120,00	0,68	82,19
28	MAQ.28	Horas	Estufa WTC Binder	2,00	0,10	0,20
<b>total precio maquinaria (€)</b>						<b>1.373,14</b>

## 5. CUADRO 4: PRECIOS DESCOMPUESTOS

Los precios descompuestos permiten conocer el coste de cada capítulo del trabajo. Como se ha comentado previamente, los capítulos se corresponden con los apartados de materiales y método, por lo cual, los capítulos se corresponderán con las diferentes tareas experimentales realizadas.

Tabla 5. Cuadro de precios descompuestos

nº código	Descripción capítulo					
1. Síntesis microesferas alginato						
1.1	Obtención de las disoluciones (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,50	Horas	0,29	0,15	
	Balanza de precisión Sartorius	0,25	Horas	0,19	0,05	
	Bañera de ultrasonidos	0,50	Horas	0,05	0,03	
	Agitador magnético con temperatura AM4 de VELP SCIENTIFICA	1,00	Horas	0,35	0,35	
	Alginato de sodio	0,20	g	0,46	0,09	
	Carbonato Cálcico	0,50	g	0,03	0,02	
	Aceite de oliva	0,20	L	3,10	0,62	
	Lecitina de soja	2,00	g	0,21	0,43	
	Ácido acético	4,00	mL	0,04	0,17	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	15,00	33,75	
	Costes indirectos	3,00	%	35,64	1,07	
	Recursos auxiliares	3,00	%	36,71	1,10	
<b>Total del capítulo 1.1</b>						<b>37,81</b>



1.2	Microfluídica microesferas alginato(ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Bomba flujo NE1000	4,00	Horas	0,34	1,37	
	Bomba de flujo PHD ultra	4,00	Horas	0,49	1,94	
	Pie de rey electrónico	0,10	Hora	0,01	0,00	
	Sistemas de microfluídica	1,00	ud	0,00	0,00	
	Medio continuo	5,00	mL	0,00	0,00	
	Medio discontinuo	150,00	mL	0,00	0,00	
	Medio colector	300,00	mL	0,00	0,00	
	Técnico de laboratorio	1,50	Horas	20,00	30,00	
	Graduada en ing. Biomédica	2,50	Horas	15,00	37,50	
	Costes indirectos	3,00	%	70,81	2,12	
	Recursos auxiliares	3,00	%	72,94	2,19	
<b>Total del capítulo 1.2</b>						<b>75,12</b>
1.3	Recogida y almacenamiento microesferas alginato (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Etanol 98%	0,01	L	3,95	0,02	
	Cloroformo	0,10	L	85,50	8,55	
	Agua miliQ	0,014	L	0,20	0,00	
	Agua destilada	0,20	L	0,20	0,04	
	Vitrina de extracción de gases VA Valles Flores	1,00	Horas	2,14	2,14	
	Técnico de laboratorio	0,50	Horas	20,00	10,00	
	Graduada en ing. Biomédica	0,50	Horas	15,00	7,50	
	Costes indirectos	3,00	%	28,26	84,77	
	Recursos auxiliares	3,00	%	113,03	3,39	
<b>Total del capítulo 1.3</b>						<b>116,42</b>
<b>2. Recubrimiento LBL</b>						
2.1	LBL Gel-Alg (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión Mettler Toledo	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador orbital PSU-2T de Biosan.	28,00	Horas	0,81	22,60	

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

	Agua miliQ	75,00	L	0,20	15,00	
	Alginato de sodio	0,02	g	0,46	0,01	
	Gelatina tipo A	0,02	g	0,43	0,01	
	Estufa 37°C	1,00	Horas	0,07	0,07	
	Agitador magnético con temperatura AM4 de VELP SCIENTIFICA	1,00	Horas	0,35	0,35	
	Agitador magnético OVAN miniMix	1,00	Horas	0,20	0,20	
	Vitrina de extracción de gases VA Valles Flores	24,00	Horas	2,14	51,37	
	glutaraldehído 25%	0,08	mL	0,39	0,03	
	Glicina	20,00	mg	0,12	2,38	
	pH-metro PH50 de Violab	1,50	horas	0,23	0,34	
	HCL	0,10	mL	0,42	0,04	
	NaOH	0,10	mL	0,40	0,04	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	15,00	33,75	
	Costes indirectos	3,00	%	126,48	3,79	
	Recursos auxiliares	3,00	%	130,28	3,91	
<b>Total del capítulo 2.1</b>						<b>134,19</b>
2.2	LbL Chi-Hep (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión Mettler Toledo	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador orbital PSU-2T de Biosan.	28,00	Horas	0,81	22,60	
	Agua miliQ	80,00	L	0,20	16,00	
	Heparina	0,02	g	1,00	0,02	
	Quitano	0,02	g	1,70	0,03	
	Cloruro de sodio (NaCl)	2,00	g	0,04	0,08	
	Agitador magnético OVAN miniMix	2,00	Horas	0,20	0,40	
	EDC	150,00	mg	0,05	7,88	
	NHS	52,00	mg	0,01	0,52	
	pH-metro PH50 de Violab	1,50	horas	0,23	0,34	
	Ácido acético	0,30	mL	0,04	0,01	
	NaOH	0,05	mL	0,40	0,02	

	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	15,00	33,75	
	Costes indirectos	3,00	%	81,95	2,46	
	Recursos auxiliares	3,00	%	84,41	2,53	
<b>Total del capítulo 2.2</b>						<b>86,94</b>
2.3	LbL PLL-Alg (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión Mettler Toledo	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador orbital PSU-2T de Biosan.	4,00	Horas	0,81	3,23	
	Agua miliQ	80,00	L	0,20	16,00	
	Poli-L-lisina	10,00	mg	2,50	25,00	
	Alginato de sodio	0,02	g	0,46	0,01	
	Cloruro de sodio (NaCl)	1,25	g	0,04	0,05	
	Agitador magnético con temperatura AM4 de VELP SCIENTIFICA	1,00	Horas	0,35	0,35	
	pH-metro PH50 de Violab	1,50	horas	0,23	0,34	
	HCl	0,10	mL	0,42	0,04	
	NaOH	0,10	mL	0,40	0,04	
	Graduada en ing. Biomédica	2,25	Horas	15,00	33,75	
	Costes indirectos	3,00	%	79,10	2,37	
	Recursos auxiliares	3,00	%	81,48	2,44	
<b>Total del capítulo 2.3</b>						<b>83,92</b>
<b>3. Caracterización morfológica microesferas</b>						
3.1	Rango de tamaños Y fluorescencia	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Microscopio óptico Nikon Eclipse TS100-F	4,00	Horas	3,44	13,74	
	Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i	4,00	Horas	2,48	9,91	
	Software Excel	2,00	Horas	0,00	0,00	
	Software ImageJ	4,00	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	6,00	Horas	15,00	90,00	
	Costes indirectos	3,00	%	113,65	3,41	

	Recursos auxiliares	3,00	%	117,06	3,51	
<b>Total del capítulo 3.1</b>						<b>120,57</b>
3.2	CrioFESEM	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Servicio microscopía UPV-CrioFESEM	4,00	Horas	30,00	120,00	
	Software ImageJ	4,00	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	8,00	Horas	15,00	120,00	
	Costes indirectos	3,00	%	240,00	7,20	
	Recursos auxiliares	3,00	%	247,20	7,42	
<b>Total del capítulo 3.2</b>						<b>254,62</b>
<b>4. Prueba de estabilidad</b>						
4.1	Medios líquidos	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Balanza de precisión Mettler Toledo	1,00	Horas	0,29	0,29	
	Agitador magnético OVAN miniMix	5,00	Horas	0,20	1,00	
	pH-metro PH50 de Violab	3,00	Horas	0,23	0,68	
	Agitador magnético con temperatura AM4 de VELP SCIENTIFICA	1,00	Horas	0,35	0,35	
	Estufa 37°C	24,00	Horas	0,10	2,40	
	Cloruro de sodio (NaCl)	3,00	g	0,04	0,12	
	Alginato de sodio	0,30	g	0,46	0,14	
	Gelatina tipo A	0,20	g	0,43	0,09	
	Heparina	0,20	g	0,05	0,01	
	Quitosano	0,20	g	1,70	0,34	
	Poli-L-lisina	100,00	mg	2,50	250,00	
	Agua miliQ	1,60	L	0,20	0,32	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	15,00	52,50	
	Costes indirectos	3,00	%	308,24	9,25	
	Recursos auxiliares	3,00	%	317,49	9,52	
<b>Total del capítulo 4.1</b>						<b>327,01</b>
4.2	Prueba estabilidad	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)

	mo alginato	100,00	mg	0,00	0,00	
	mo LBL Gel-Alg	100,00	mg	0,00	0,00	
	mo LBL Chi-Hep	100,00	mg	0,00	0,00	
	mo PLL-Alg	100,00	mg	0,00	0,00	
	Agua sin NaCl (pH7)	300,00	mL	0,00	0,00	
	Agua 0,25M NaCl pH 5,5	200,00	mL	0,00	0,00	
	Solución gelatina 1% p/v pH 7	200,00	mL	0,00	0,00	
	Solución alginato 1% p/v pH 7	300,00	mL	0,00	0,00	
	Solución heparina 1% p/v con 0,25 NaCl pH 5,5	200,00	mL	0,00	0,00	
	Solución quitosano 1% p/v con 0,25 NaCl pH 5,5	200,00	mL	0,00	0,00	
	Solución PLL 1% p/v con pH 7	200,00	mL	0,00	0,00	
	EDTA	400,00	mL		0,00	
	RPMI 1640	400,00	mL	0,47	188,00	
	Microscopio óptico Nikon Eclipse TS100-F	1,50	Horas	3,44	5,15	
	Software ImageJ	0,20	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	3,50	Horas	15,00	52,50	
	Costes indirectos	3,00	%	245,65	7,37	
	Recursos auxiliares	3,00	%	253,02	7,59	
<b>Total del capítulo 4.2</b>						<b>260,61</b>
5. Caracterización bioquímica						
5.1	FTIR	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	mo alginato	100,00	μL	0,00	0,00	
	mo LBL Gel-Alg	100,00	μL	0,00	0,00	
	mo LBL Chi-Hep	100,00	μL	0,00	0,00	
	mo PLL-Alg	100,00	μL	0,00	0,00	
	Origin software	1,50	Horas	0,00	0,00	
	Espectrofotómetro ALPHA FT-IR (Bruker)	1,00	Horas	4,28	4,28	
	Graduada en ing. Biomédica	1,00	Horas	15,00	15,00	
	Costes indirectos	3,00	%	19,28	0,58	
	Recursos auxiliares	3,00	%	19,86	0,60	
<b>Total del capítulo 5.1</b>						<b>20,46</b>

5.2	TGA	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	mo alginato	55,00	mg	0,00	0,00	
	mo LBL Gel-Alg	55,00	mg	0,00	0,00	
	mo LBL Chi-Hep	55,00	mg	0,00	0,00	
	mo PLL-Alg	55,00	mg	0,00	0,00	
	TGA/DSC 2 de Mettler Toledo	12,00	Horas	5,14	61,64	
	Excel software	5,00	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	4,50	Horas	15,00	67,50	
	Costes indirectos	3,00	%	129,14	3,87	
	Recursos auxiliares	3,00	%	133,02	3,99	
<b>Total del capítulo 5.2</b>						<b>137,01</b>
5.3	Blyscan	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	0,25	Horas	2,49	0,62	
	Kit B1000 Blyscan	0,10	ud	290,00	29,00	
	mo LBL Chi-Hep	60,00	µL	0,00	0,00	
	mo alginato	30,00	µL	0,00	0,00	
	Excel software	1,00	Horas	0,00	0,00	
	GraphPad software	1,00	Hora	0,00	0,00	
	Agitador orbital PSU-2T de Biosan.	0,750	Horas	0,81	0,61	
	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	0,50	Horas	3,63	1,81	
	Graduada en ing. Biomédica	4,00	Horas	15,00	60,00	
	Costes indirectos	3,00	%	92,04	2,76	
	Recursos auxiliares	3,00	%	94,80	2,84	
<b>Total del capítulo 5.3</b>						<b>97,65</b>
5.4	BCA	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	0,50	Horas	2,49	1,25	
	Kit análisis proteico BCA (Thermofisher)	0,10	ud	236,55	23,66	

	mo LBL Gel-Alg	200,00	μL	0,00	0,00	
	mo alginato	200,00	μL	0,00	0,00	
	Excel software	1,00	Horas	0,00	0,00	
	GraphPad software	1,00	Hora	0,00	0,00	
	Agitador orbital PSU-2T de Biosan.	0,750	Horas	0,81	0,61	
	Estufa WTC Binder	2,00	Horas	0,10	0,20	
	Graduada en ing. Biomédica	4,50	Horas	15,00	67,50	
	Costes indirectos	3,00	%	93,21	2,80	
	Recursos auxiliares	3,00	%	96,00	2,88	
<b>Total del capítulo 5.2</b>						<b>98,88</b>
5.5	Ninhidrina	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	acetato de litio dihidrato	4,08	g	0,25	1,02	
	ninhidrina	0,80	g	3,06	2,45	
	hidrindantina	0,12	g	4,54	0,54	
	Etilenglicol	40,00	mL	0,08	3,20	
	Ácido acético	2,00	mL	0,04	0,09	
	NaOH	2,00	mL	0,40	0,80	
	Agua miliQ	0,006	L	0,20	0,00	
	mo LBL PLL-alg	20,00	μL	0,00	0,00	
	mo alginato	20,00	μL	0,00	0,00	
	pH-metro PH50 de Violab	1,00	Horas	0,23	0,23	
	Agitador magnético OVAN miniMix	5,00	Horas	0,20	1,00	
	Baño térmico Digiterm 200P SELECTA	0,50	Horas	0,02	0,01	
	Graduada en ing. Biomédica	2,00	Horas	15,00	30,00	
	Costes indirectos	3,00	%	39,34	1,18	
	Recursos auxiliares	3,00	%	40,52	1,22	
<b>Total del capítulo 5.3</b>						<b>41,73</b>
<b>6. Descongelado, expansión y cultivo celular</b>						
6.1	Preparado de los materiales	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	RPMI 1640	49,00	mL	0,47	23,03	
	L-glutamina	0,50	mL	0,21	0,11	

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

	Penicilina-estreptomicina	0,50	mL	0,27	0,14	
	Campana de flujo laminar Faster TWO30	4,00	Horas	0,17	0,68	
	Baño termostático BAE 04 (Raypar)	1,00	Hora	0,45	0,45	
	Cloruro de sodio (NaCl)	9,00	g	0,04	0,36	
	Agua miliQ	1,15	L	0,20	0,23	
	cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	15,00	g	1,21	18,15	
	Etanol 98%	0,35	L	3,95	1,38	
	mo LBL Chi-Hep	500,00	μL	0,00	0,00	
	mo LBL PLL-alg	500,00	μL		0,00	
	Autoclave MOCOM extrema-prima-proxima	0,50	Horas	0,15	0,07	
	Graduada en ing. Biomédica	4,00	Horas	15,00	60,00	
	Técnico de laboratorio	4,00	Horas	20,00	80,00	
	Costes indirectos	3,00	%	104,60	3,14	
	Recursos auxiliares	3,00	%	187,74	5,63	
<b>Total del capítulo 6.2</b>						<b>193,37</b>
6.2	Descongelado y expansión celular (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	0,10	Horas	3,63	0,36	
	Incubadora CO2 Thermo Fisher Scientific VIOS 160i	84,00	Horas	2,12	178,08	
	Baño termostático BAE 04 (Raypar)	0,25	Horas	0,45	0,11	
	Neubauer	0,50	Horas	0,01	0,01	
	Campana de flujo laminar Faster TWO30	4,00	Horas	0,17	0,68	
	RPMI 1640	44,00	mL	0,47	20,68	
	L-glutamina	0,50	mL	0,21	0,11	
	Penicilina-estreptomicina	0,50	mL	0,27	0,14	
	FBS	5,00	mL	0,38	1,90	



DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

	Células mieloma múltiple (RPMI 8226)	2,00	Vial	738,50	1.477,00	
	Graduada en ing. Biomédica	4,00	Horas	15,00	60,00	
	Técnico de laboratorio	4,00	Horas	20,00	80,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.819,06	54,57	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.873,63	56,21	<b>1.929,84</b>
6.3	Cultivo celular con materiales	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Incubadora CO2 Thermo Fisher Scientific VIOS 160i	120,00	Horas	2,12	254,11	
	Baño termostático BAE 04 (Raypar)	4,00	Horas	0,45	1,80	
	Neubauer	0,50	Horas	0,01	0,01	
	Campana de flujo laminar Faster TWO30	10,00	Horas	0,17	1,70	
	RPMI 1640	88,00	mL	0,47	41,36	
	L-glutamina	1,00	mL	0,21	0,21	
	Penicilina-estreptomicina	1,00	mL	0,27	0,27	
	FBS	10,00	mL	0,38	3,80	
	Células mieloma múltiple (RPMI 8226) expandidas en 6.2	2,00	Viales	0,00	0,00	
	mo LBL PLL-alg acondicionadas en 6.1	126,00	µL	0,00	0,00	
	mo LBL Chi-Hep acondicionadas en 6.1	126,00	µL	0,00	0,00	
	Agitador de tubos rotatorio Bio RS-24 Biosan	120,00	Horas	0,68	82,19	
	Graduada en ing. Biomédica	7,00	Horas	15,00	105,00	
	Técnico de laboratorio	7,00	Horas	20,00	140,00	
	Costes indirectos	3,00	%	630,45	18,91	
	Recursos auxiliares	3,00	%	649,36	19,48	
<b>Total del capítulo 7.2</b>						<b>668,84</b>
7. Medida de la proliferación celular						
7.1	PicoGreen (ud)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)

	Congelador	72,00	Horas	0,63	45,36	
	Perkin Elmer Victor X3 Multilabel Placa Lector	1,00	Horas	2,49	2,49	
	Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	20,00	g	0,22	4,40	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,70	g	0,14	0,10	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,70	g	0,11	0,08	
	hidrocloruro de l-cisteína hidratado	0,06	g	0,50	0,03	
	solución papaína	5,00	mg	2,48	12,40	
	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit	0,10	ud	812,00	81,20	
	Excel	1,50	Horas	0,00	0,00	
	Graduada en ing. Biomédica	5,00	Horas	15,00	75,00	
	Técnico de laboratorio	4,00	Horas	20,00	80,00	
	Costes indirectos	3,00	%	301,06	9,03	
	Recursos auxiliares	3,00	%	310,09	9,30	
<b>Total del capítulo 7.4</b>						<b>274,03</b>
<b>8. Equipos de protección individual y seguridad</b>						
<b>8.1</b>	<b>EPIs (ud)</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>precio por ud (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Bata de laboratorio	2,00	ud	22,50	45,00	
	Máscara de gases	1,00	ud	30,60	30,60	
	Máscara de partículas	1,00	ud	7,35	7,35	
	Caja de guantes de látex (100 uds)	2,00	ud	5,85	11,70	
	Caja de guantes de nitrilo (100 uds)	2,00	ud	7,95	15,90	
	Visera de protección facial	1,00	ud	8,50	8,50	
	Costes indirectos	3,00	%	119,05	3,57	
<b>Total del capítulo 9.1</b>						<b>122,62</b>
<b>9. Material inventariable/fungible</b>						
<b>9.1</b>	<b>Material inventariable/fungible (ud)</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Tamiz pluriselect 60 µm de poro	6,00	ud	2,42	14,52	
	Acople vacío falcon 50 mL	3,00	ud	-	0,00	
	pipeta Pasteur	20,00	ud	0,20	4,00	
	Flascon cultivo T25	1,00	ud	1,45	1,45	

DESARROLLO DE MICROGELES BASADOS EN MICROCÁPSULAS HUECAS PARA GENERAR MODELOS DE ENFERMEDAD DE MIELOMA MÚLTIPLE

	Placa multipocillo p96 transparente	3,00	ud	2,92	8,76
	Placa multipocillo p96 negra	3,00	ud	3,10	9,30
	Vaso precipitados 50 mL	10,00	ud	3,29	32,90
	Placa cultivo p96-estéril	4,00	ud	1,39	5,56
	Micropipeta 1000 µL (Themo)	1,00	ud	215,00	215,00
	Micropipeta 200 µL (Themo)	1,00	ud	215,00	215,00
	Micropipeta 20 µL (Themo)	1,00	ud	215,00	215,00
	Pipeta electrónica "easypet3" (Eppendorf)	1,00	ud	466,00	466,00
	Punta pipeta 25 mL	10,00	ud	0,47	4,70
	Puntas micropipeta 100-1000 µL	250,00	ud	0,03	7,50
	Puntas micropipeta 2-200 µL	110,00	ud	0,04	4,40
	Eppendorf 1,5 mL	100,00	ud	0,07	7,00
	criotubos rosca 2 mL	28,00	ud	0,42	11,72
	Tubos falcon 50 mL	30,00	ud	0,12	3,60
	Tubos falcon 15 mL	15,00	ud	0,10	1,50
	Pinzas laboratorio	1,00	ud	8,99	8,99
	Espátula metálica laboratorio	2,00	ud	3,99	7,98
	Espátula teflón laboratorio	1,00	ud	1,99	1,99
	Frasco 50 mL	6,00	ud	3,65	21,90
	Vaso precipitados 3 L	1,00	ud	5,83	5,83
	Portaobjetos	10,00	ud	0,22	2,17
	Papel de aluminio	1,00	m	0,11	0,11
	Jeringuilla 6 mL	10,00	ud	0,74	7,40
	Aguja para microfluídica	6,00	ud	0,40	2,40
	Tubo elástico para microfluídica	1,20	m	0,75	0,90
	Tamiz con tamaño de poro de 40 µm	40,00	ud	0,57	22,80
	Bolsas zip	10,00	ud	0,12	1,20
	Jeringuillas 50 mL	10,00	ud	0,83	8,30

	Tubos 1,5 mL con tapa de rosca	28,00	ud	0,17	4,69	
	Tubos eppendorf de 2 mL	100,00	ud	0,03	2,52	
	Pinceles silicona	2,00	ud	8,30	16,60	
	Costes indirectos	3,00	%	1.343,69	40,31	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.384,00	41,52	
<b>Total del capítulo 10.1</b>						<b>1.425,52</b>
<b>10. Reuniones del proyecto</b>						
10.1	Reuniones de planificación (horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	20,00	Horas	15,00	300,00	
	Tutores responsables del proyecto	15,00	Horas	45,00	675,00	
	Técnico de laboratorio	20,00	Horas	20,00	400,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.375,00	41,25	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.416,25	42,49	
<b>Total del capítulo 11.1</b>						<b>1.458,74</b>
10.2	Reuniones de resultados (Horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	20,00	Horas	15,00	300,00	
	Tutores responsables del proyecto	20,00	Horas	45,00	900,00	
	Técnico de laboratorio	15,00	Horas	20,00	300,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.500,00	45,00	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.545,00	46,35	
<b>Total del capítulo 11.2</b>						<b>1.591,35</b>
10.3	Redacción y correcciones (horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Graduada en ing. Biomédica	90,00	Horas	15,00	1.350,00	
	Costes indirectos	3,00	%	1.350,00	40,50	
	Recursos auxiliares	3,00	%	1.390,50	41,72	
<b>Total del capítulo 11.3</b>						<b>1.432,22</b>

## 6. PRESUPUESTOS PARCIALES

En la siguiente tabla se resume el presupuesto descompuesto poniendo solo los resultados globales de cada subcapítulo, teniendo en cuenta esta vez la cantidad de ocasiones en las que se ha realizado dicha tarea.

Tabla 6. Cuadro de presupuestos parciales

1	1. Síntesis microesferas alginato				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
1.1	Obtención de las disoluciones (ud)	ud	10	37,81	378,14
1.2	Microfluídica microesferas alginato(ud)	ud	30	75,12	2.253,72
1.3	Recogida y almacenamiento microesferas alginato (ud)	ud	30	116,42	3.492,55
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 1</b>					<b>6.124,41</b>
2	2. Recubrimiento LBL				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
2.1	LBL Gel-Alg (ud)	ud	4	134,19	536,74
2.2	LbL Chi-Hep (ud)	ud	4	86,94	347,76
2.3	LbL PLL-Alg (ud)	ud	3	83,92	251,76
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 2</b>					<b>1.136,27</b>
3	3. Caracterización morfológica microesferas				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
3.1	Rango de tamaños y fluorescencia	ud	1	120,57	120,57
3.2	CrioFESEM	ud	1	254,62	254,62
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 3</b>					<b>375,19</b>
4	4. Prueba de estabilidad				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
4.1	Medios líquidos	ud	1	327,01	327,01
4.2	Prueba de estabilidad	ud	1	260,61	260,61
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 4</b>					<b>587,63</b>
5	5. Caracterización bioquímica				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)

5.1	FTIR	ud	1	20,46	20,46
5.2	TGA	ud	1	137,01	137,01
5.3	Blyscan	ud	1	97,65	97,65
5.4	BCA	ud	1	98,88	98,88
5.5	Ninhidrina	ud	1	41,73	41,73
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 5</b>					<b>395,73</b>
6	6. Descongelado, expansión y cultivo celular				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
6.1	Preparado de los materiales	ud	1	193,37	193,37
6.2	Descongelado y expansión celular	ud	1	1929,84	1.929,84
6.3	Cultivo de los materiales	ud	1	668,84	668,84
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 6</b>					<b>2.792,05</b>
7	7. Medida de la proliferación celular				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
7.1	PicoGreen	ud	1	274,03	274,03
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 7</b>					<b>274,03</b>
8	8. Equipos de protección individual y seguridad				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
8.1	EPIs	ud	1	122,62	122,62 €
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 8</b>					<b>122,62</b>
9	9. Material inventariable/fungible				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
9.1	Material inventariable/fungible	ud	1	1425,52	1.425,52
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 9</b>					<b>1.425,52</b>
10	10. Reuniones del proyecto				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
10.1	Reuniones de planificación	1	ud	1458,74	1.458,74
10.2	Reuniones de resultados	1	ud	1591,35	1.591,35
10.3	Redacción y correcciones	1	ud	1432,22	1.432,22
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 10</b>					<b>4.482,30</b>

## 7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

### Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación

1. Síntesis microesferas alginato	6.124,41 €
2. Recubrimiento LBL	1.136,27 €
3. Caracterización morfológica microesferas	375,19 €
4. Prueba de estabilidad	587,63 €
5. Caracterización bioquímica	395,73 €
6. Descongelado, expansión y cultivo celular	2.792,05 €
7. Medida de la proliferación celular	274,03 €
8. Equipos de protección individual y seguridad	122,62 €
9. Material inventariable/fungible	1.425,52 €
10. Reuniones del proyecto	4.482,30 €
<b>Total:</b>	<b>17.715,75 €</b>

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **DIECISIETE MIL SETECIENTOS QUINCE EUROS CON SETENTA Y CINCO CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución material	<b>17.715,75</b>
Gastos generales (13 %)	2.303,05 €
<b>Beneficio industrial (0%)</b>	<b>20.018,79 €</b>

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **VENTEMIL MIL DIECIOCHO EUROS CON SETENTA Y NUEVE CÉNTIMOS**

Presupuesto de ejecución por contrata	<b>20.018,79 €</b>
IVA (21%)	4.203,95 €
<b>Presupuesto base de licitación</b>	<b>24.222,74 €</b>

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **VENTICUATRO MIL DOSCIENTOS VEINTIDOS EUROS CON SETENTA Y CUATRO CÉNTIMOS**