



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Obtención de microgeles que incorporan fibroína de seda  
para el cultivo celular en entornos 3D fluidos.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Fernández Collados, Beatriz

Tutor/a: Gómez Ribelles, José Luís

Cotutor/a: García Briega, María Inmaculada

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

## Trabajo Final de Grado

Grado en Biotecnología (2018-2022)

---

# OBTENCIÓN DE MICROGELES QUE INCORPORAN FIBROÍNA DE SEDA PARA EL CULTIVO CELULAR EN ENTORNOS 3D FLUIDOS

---

**Autora:** Beatriz Fernández Collados

**Tutor:** José Luís Gómez Ribelles

**Cotutora:** María Inmaculada García Briega

29 de julio de 2022, València

# OBTENCIÓN DE MICROGELES QUE INCORPORAN FIBROÍNA DE SEDA PARA EL CULTIVO CELULAR EN ENTORNOS 3D FLUIDOS

## RESUMEN

La fibroína, la proteína principal de la seda, ha sido durante mucho tiempo un biomaterial ampliamente utilizado por sus excelentes propiedades mecánicas o su biocompatibilidad. En el campo de la ingeniería tisular se ha empleado en diversas aplicaciones, especialmente en la regeneración ósea y vascular debido a la gran cantidad de conformaciones en las que se puede disponer. Ante la necesidad de desarrollar modelos tridimensionales biomiméticos del microambiente celular, se está planteando el uso de la fibroína de seda como soporte macroporoso de células tumorales. En esta área, se plantea el objetivo principal de este trabajo: la generación de un microgel que incorpore fibroína de seda para el desarrollo de una plataforma de cultivo apta para la proliferación de células de Mieloma Múltiple, una neoplasia hematológica que afecta a las células plasmáticas del sistema inmunitario.

Para ello, mediante microfluídica se han generado microesferas magnéticas con base de alginato en un rango estable de tamaños. Estas microesferas han sido funcionalizadas con dos biopolímeros, poli-L-Lisina y condroitín sulfato mediante la técnica *Layer-by-Layer*. La fibroína de seda se ha injertado sobre la superficie del recubrimiento aprovechando la química del glutaraldehído y de la carbodiimida. Se ha caracterizado la morfología de las microesferas obtenidas, así como de sus recubrimientos e injertos mediante diversas técnicas como la microscopía óptica y electrónica de barrido, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier o termogravimetría.

La respuesta biológica al entorno tridimensional generado se ha analizado mediante cultivos de células plasmáticas tumorales de Mieloma Múltiple pertenecientes a la línea celular RPMI 8226. Los cultivos se han realizado en criotubos en medio líquido en el que se ha mantenido en suspensión tanto a las células como al microgel bajo una agitación suave. Se ha evaluado y comparado la proliferación y viabilidad celular mediante un ensayo MTS de un microgel que incorpora fibroína de seda respecto a otro que no la contenía. Con este ensayo se ha concluido que los microgeles con fibroína de seda entrecruzados con glutaraldehído no han repercutido sobre la viabilidad de las células, resultando ser biocompatibles.

En conclusión, se han conseguido los objetivos propuestos y se han desarrollado microgeles que simulan el nicho biológico del entorno de las células plasmáticas tumorales competentes para el estudio del Mieloma Múltiple.

**PALABRAS CLAVE:** fibroína de seda, *Layer-by-Layer*, microgeles, modelo de enfermedad, Mieloma Múltiple

**ALUMNA:** BEATRIZ FERNÁNDEZ COLLADOS

**TUTOR:** JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

**COTUTORA:** MARÍA INMACULADA GARCÍA BRIEGA

Valencia, 29 de julio de 2022

# OBTAINING MICROGELS THAT INCORPORATE SILK FIBROIN FOR CELL CULTURE IN FLUID 3D ENVIRONMENTS

## ABSTRACT

Fibroin, the main protein in silk, has long been a widely used biomaterial due to its excellent mechanical properties or its biocompatibility. In the field of tissue engineering, it has been used in various applications, especially in bone and vascular regeneration due to the large number of conformations in which it is available. In view of the need to develop biomimetic three-dimensional models of the cellular microenvironment, the use of silk fibroin as a scaffold for tumour cells is being considered. In this area, the main objective of this project is the generation of a microgel incorporating silk fibroin in order to develop a culture platform suitable for the proliferation of Multiple Myeloma cells, a haematological neoplasm which affects the plasma cells of the immune system.

For this purpose, alginate-based magnetic microspheres have been generated using microfluidics in a stable range of sizes. These microspheres have been functionalised with two biopolymers, poly-L-lysine and chondroitin sulphate using the *Layer-by-Layer* technique. The silk fibroin has been grafted onto the surface of the coating by exploiting the chemistry of glutaraldehyde and carbodiimide. The morphology of the microspheres obtained, as well as their coatings and grafts, has been characterised using various techniques such as optical and scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetry.

The biological response to the generated three-dimensional environment has been analysed using cultures of Multiple Myeloma tumour plasma cells belonging to the RPMI 8226 cell line. The cultures were grown in cryotubes in liquid medium in which both the cells and the microgel were kept in suspension under gentle agitation. Cell proliferation and viability were evaluated and compared by MTS assay of a microgel incorporating silk fibroin versus a microgel without silk fibroin. This assay concluded that microgels with silk fibroin cross-linked with glutaraldehyde did not affect cell viability and were biocompatible.

In conclusion, the proposed objectives have been achieved. Microgels capable of simulating the biological niche of the environment of tumour-competent plasma cells for the study of Multiple Myeloma have been developed.

**KEYWORDS:** silk fibroin, *Layer-by-Layer*, microgels, disease model, Multiple Myeloma

**STUDENT:** BEATRIZ FERNÁNDEZ COLLADOS

**TUTOR:** JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

**COTUTOR:** MARÍA INMACULADA GARCÍA BRIEGA

Valencia, 29<sup>th</sup> July 2022

# OBTENCIÓ DE MICROGELS QUE INCORPOREN FIBROÏNA DE SEDA PER AL CULTIU CEL·LULAR EN ENTORNS 3D FLUIDS

## RESUM

La fibroïna, la principal proteïna de la seda, ha sigut durant molt de temps un biomaterial àmpliament utilitzat per les seues excel·lents propietats mecàniques o la seva biocompatibilitat. Al camp de l'enginyeria tissular s'ha emprat en diverses aplicacions, especialment a la regeneració òssia i vascular a causa de la gran quantitat de conformacions en què es pot disposar. Davant la necessitat de desenvolupar models tridimensionals biomimètics del microambient cel·lular, s'està plantejant l'ús de la fibroïna de seda com a suport macroporós de cèl·lules tumorals. En aquesta àrea, es planteja l'objectiu principal del treball: la generació d'un microgel que incorpori fibroïna de seda per al desenvolupament d'una plataforma de cultiu apta per a la proliferació de cèl·lules de Mieloma Múltiple, una neoplàsia hematològica que afecta les cèl·lules plasmàtiques del sistema immunitari.

Per això, mitjançant microfluídica s'han generat microesferes magnètiques amb base d'alginat en un rang de mides prou estable. Aquestes microesferes han sigut funcionalitzades amb dos biopolímers, poli-L-Lisina i condroití sulfat mitjançant la tècnica Layer-by-Layer. La fibroïna de seda s'ha empeltat sobre la superfície del recobriment aprofitant la química del glutaraldehyd i de la carbodiimida. S'ha caracteritzat la morfologia de les microesferes obtingudes, així com dels seus recobriments i empelts mitjançant diverses tècniques com la microscòpia òptica i electrònica d'escombrada, espectroscòpia d'infrarojos per transformada de Fourier o termogravimetria.

La resposta biològica a l'entorn tridimensional generat s'ha analitzat mitjançant cultius de cèl·lules plasmàtiques tumorals de Mieloma Múltiple pertanyents a la línia cel·lular RPMI 8226. Els cultius s'han realitzat en criotubs en medi líquid en què s'ha mantingut a suspensió tant a les cèl·lules com al microgel sota una agitació suau. S'ha avaluat i comparat la proliferació i viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTS d'un microgel que incorpora fibroïna de seda respecte a un altre que no la contenia. Amb aquest assaig s'ha conclòs que els microgels amb fibroïna de seda entrecreuats amb glutaraldehyd no han repercutit sobre la viabilitat de les cèl·lules, resultant ser biocompatibles.

En conclusió, s'han aconseguit els objectius proposats i s'han desenvolupat microgels que simulen el nínxol biològic de l'entorn de les cèl·lules plasmàtiques tumorals competents per a l'estudi del Mieloma Múltiple.

**PARAULES CLAU:** fibroïna de seda, Layer-by-Layer, microgels, model de malaltia, Mieloma Múltiple.

**ALUMNA:** BEATRIZ FERNÁNDEZ COLLADOS

**TUTOR:** JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

**COTUTORA:** MARÍA INMACULADA GARCÍA BRIEGA

València, 29 de juliol de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutor, José Luís Gómez Ribelles por haberme dado la oportunidad de realizar mi TFG en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, por su ayuda, sus ideas e indicaciones, tiempo y amabilidad. También a mi cotutora, Inma García, por su dedicación y por haberme enseñado tanto durante estos meses. Agradecer además a todos los compañeros del CBIT, por su ayuda, simpatía y por crear un espacio de trabajo cómodo.*

*Me gustaría agradecer también a los compañeros del Centro de Tecnología Biomédica de Madrid por habernos enviado la fibroína de seda liofilizada, el material en torno al que gira este trabajo.*

*Por otra parte, me gustaría agradecer todo el apoyo incondicional prestado por mi familia, mi pareja y amigos. Sin ellos no habría sido posible.*

*A todos ellos, gracias, por haber confiado en mí para conseguir mis propósitos.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. FIBROÍNA DE SEDA</b>	<b>1</b>
1.1.1. Origen y química	1
1.1.2. Propiedades y aplicaciones de la fibroína de seda en el campo de la ingeniería tisular	1
<b>1.2. MICROGELES</b>	<b>2</b>
1.2.1. Forma de obtención: microfluídica	2
<b>1.3. MATERIALES DE SOPORTE PARA LAS MICROESFERAS</b>	<b>3</b>
1.3.1. Alginato (ALG)	3
1.3.2. Nanopartículas de ferrita (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	4
<b>1.4. FUNCIONALIZACIONES</b>	<b>4</b>
1.4.1. Injertos	5
1.4.1.1. Injerto directo con GA	5
1.4.1.2. Injerto con EDC/NHS	6
1.4.2. <i>Layer-By-Layer</i> (LbL)	6
<b>1.5. MIELOMA MÚLTIPLE</b>	<b>7</b>
1.5.1. Origen, clasificación y epidemiología	7
1.5.2. Bases moleculares y evolución clonal	8
1.5.3. Diagnóstico y cuadro clínico	9
<b>1.6. PLATAFORMAS DE CULTIVO Y MODELOS DE ENFERMEDAD</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>3.1. MATERIALES Y REACTIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3.2. SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE ALGINATO MAGNÉTICAS (M.ALG.MAGN)</b>	<b>11</b>
3.2.1. Preparación de las disoluciones	11
3.2.2. Síntesis de las microesferas por microfluídica	12
<b>3.3. OBTENCIÓN DE MICROESFERAS DE FIBROÍNA DE SEDA</b>	<b>13</b>
<b>3.4. SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE MEZCLAS DE ALGINATO Y FIBROÍNA DE SEDA (M.ALG-SF)</b>	<b>14</b>
<b>3.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FERRITA EN LAS MICROESFERAS DE ALGINATO MAGNÉTICAS</b>	<b>14</b>
<b>3.6. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN AGUA EN EQUILIBRIO DE LAS MICROESFERAS DE ALGINATO MAGNÉTICAS (EWC)</b>	<b>14</b>
<b>3.7. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS POR LAYER-BY-LAYER (LbL)</b>	<b>15</b>
3.7.1. Condiciones generales del proceso LbL	15
3.7.2. <i>Layer-by-Layer</i> PLL-CS (M.ALG.MAGN.PREC)	15
3.7.3. <i>Layer-by-Layer</i> PLL-SF (M.ALG.MAGN.PLL-SF)	16
<b>3.8. FUNCIONALIZACIÓN DE MICROESFERAS CON INJERTOS DE SF</b>	<b>16</b>
3.8.1. Injerto por glutaraldehído (M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA))	17
3.8.2. Injerto por EDC/NHS (M.ALG.MAGN.PREC-SF(EDC/NHS))	17

<b>3.9.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS</b> .....	17
3.9.1.	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo criogénico (CRYO-FESEM) .....	18
3.9.2.	Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) .....	18
3.9.3.	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	18
<b>3.10.</b>	<b>ENSAYO DE ESTABILIDAD</b> .....	19
<b>3.11.</b>	<b>CULTIVO CELULAR</b> .....	19
3.11.1.	Descongelación y expansión celular.....	20
3.11.2.	Desinfección de materiales.....	20
3.11.3.	Siembra y mantenimiento del microgel.....	21
3.11.4.	Ensayo de proliferación y viabilidad celular (MTS) .....	21
<b>3.12.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1.</b>	<b>DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3.</b>	<b>CRYO-FESEM</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS</b> 26	
4.4.1.	FTIR.....	26
4.4.2.	TGA.....	29
<b>4.5.</b>	<b>MICROESFERAS DE FIBROÍNA DE SEDA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS ALGINATO-FIBROÍNA</b> .....	<b>31</b>
4.6.1.	Microscopía óptica .....	31
4.6.2.	FTIR.....	32
4.6.3.	TGA.....	33
<b>4.7.</b>	<b>ENSAYO DE ESTABILIDAD</b> .....	<b>33</b>
<b>4.8.</b>	<b>CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>41</b>
<b>7.1.</b>	<b>RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS PROMEDIO DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS Y SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b> .....	<b>41</b>
<b>7.2.</b>	<b>RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> EN LAS MICROESFERAS DE ALGINATO</b> .....	<b>41</b>
<b>7.3.</b>	<b>RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE INCORPORACIÓN DE SF EN LAS MICROESFERAS MEDIANTE FTIR</b> .....	<b>42</b>
<b>7.4.</b>	<b>FIGURAS COMPLEMENTARIAS DEL ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO</b> .....	<b>43</b>
<b>7.5.</b>	<b>RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	<b>50</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la fibroína de seda. A) Representación de los dominios cristalinos (láminas $\beta$ ) y amorfos de la SF, (Li & Sun, 2022). B) Estructura química de la SF, (Lancashire, 2011).....	1
<b>Figura 2.</b> Modos de ruptura de gotas aplicados a distintas geometrías de canales, (Li <i>et al.</i> , 2018).....	3
<b>Figura 3.</b> Una de las posibles combinaciones de formación de la estructura química del alginato, (Sun & Tan, 2013).....	4
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del proceso LbL, (Watanabe <i>et al.</i> , 2020).....	6
<b>Figura 5.</b> A) Estructura química de la PLL (Santa Cruz Biotechnology); B) Estructura del CS con grupos sulfato en distintas posiciones, (Mikami & Kitagawa, 2013).....	7
<b>Figura 6.</b> Comparación entre células plasmáticas sanas y afectadas por Mieloma Múltiple. Realizado con BioRender.....	7
<b>Figura 7.</b> Sistema de microfluídica empleado para la síntesis de microesferas.....	11
<b>Figura 8.</b> Montaje para la síntesis de microesferas de alginato magnéticas.....	13
<b>Figura 9.</b> Esquema del diseño de las series del cultivo celular y sus componentes. Realizado con BioRender.....	20
<b>Figura 10.</b> Distribución de tamaños de las microesferas de alginato magnéticas.....	23
<b>Figura 11.</b> Microesferas de alginato magnéticas sintetizadas a unos valores de flujo de medio continuo de 65mL/h y 1,55mL/h de discontinuo: A) Histograma de la distribución de tamaños; B) Observadas en el microscopio óptico invertido. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .....	24
<b>Figura 12.</b> Microesfera de alginato magnética: A) A 600 aumentos; B) Detalle de su superficie a 6000 aumentos.....	26
<b>Figura 13.</b> Microesfera de alginato magnética funcionalizada con la precapa e injerto de SF mediante GA: A) A 600 aumentos; B) Detalle de su superficie a 6000 aumentos.....	26
<b>Figura 14.</b> Espectros de FTIR M.ALG., M.ALG.MAGN. y M.ALG.MAGN.PREC. con sus picos característicos.....	27
<b>Figura 15.</b> Espectros FTIR de las M.ALG.MAGN.PREC, M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA) y la SF pura con sus picos característicos.....	28
<b>Figura 16.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN. y M.ALG.MAGN.PREC	29
<b>Figura 17.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA) y la SF pura con ajuste a una gaussiana.....	30
<b>Figura 18.</b> Micropartículas de SF: A) A la salida del sistema de microfluídica; B) Tras overnight en metanol; C) Tras lavados con etanol 98%. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .....	31
<b>Figura 19.</b> Microesferas de alginato-fibroína de seda: A) Tras su síntesis; B) Tras inducir la cristalización con etanol y EDC/NHS overnight; C) Tras inducir la cristalización con GA y Gly overnight. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .....	32

<b>Figura 20.</b> Espectros FTIR de las M.ALG-SF(GA), M.ALG-SF(EDC/NHS), M.ALG y SF pura.....	32
<b>Figura 21.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG-SF y SF pura con ajuste a una gaussiana.....	33
<b>Figura 22.</b> M.ALG.MAGN.PREC, M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA), M.ALG-SF(EDC/NHS), M.ALG-SF(GA) en medio de cultivo RPMI 1640 a 0, 2 y 5 días. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .....	34
<b>Figura 23.</b> M.ALG-SF(EDC/NHS) y M.ALG-SF(GA) en EDTA a 0, 2 y 5 días. Barra de escala 100 $\mu\text{m}$ .....	34
<b>Figura 24.</b> Ensayo MTS de proliferación celular a 1 y 3 días en la suspensión de MMC, los microgeles M.ALG.MAGN.PREC y M.ALG.MAGN.PREC-SF.....	35
<b>Figura 25.</b> Espectros FTIR complementarios de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA); M.ALG.MAGN.PREC-SF(EDC/NHS); M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF); M.ALG.MAGN.PLL-SF y la SF pura con sus picos característicos.....	42
<b>Figura 26.</b> A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN húmedas en el TGA; B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las M.ALG.MAGN.....	43
<b>Figura 27.</b> A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN.PREC. húmedas en el TGA; B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC.....	44
<b>Figura 28.</b> A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA). húmedas en el TGA; B) Evolución de su porcentaje en peso en seco.....	45
<b>Figura 29.</b> A) Pérdida de peso de la SF pura. B) Evolución de su porcentaje en peso en seco.....	46
<b>Figura 30.</b> A) Pérdida de peso de las M.ALG-SF húmedas en el TGA. B) Evolución de su porcentaje en peso en seco.....	47
<b>Figura 31.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF.....	48
<b>Figura 32.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (EDC/NHS).....	48
<b>Figura 33.</b> Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PLL-SF.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diámetro de las microesferas de alginato magnéticas en un rango acotado.....	24
<b>Tabla 2.</b> Diámetro y desviación estándar de las microesferas de alginato magnéticas en función de los parámetros de microfluídica.....	41
<b>Tabla 3.</b> Resultados del análisis estadístico del ensayo de determinación de la concentración de $Fe_3O_4$ en las microesferas de alginato. Se muestra el análisis de múltiples comparaciones que indica la significancia estadística entre las muestras.....	41
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis estadístico del ensayo MTS. Se muestra el análisis de múltiples comparaciones que indica la significancia estadística entre las muestras.....	50

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ALG:** Alginato

**CRYO-FESEM:** Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo Criogénico

**CS:** Condroitín sulfato

**CTB:** Centro de Tecnología Biomédica

**ECM:** Matriz extracelular

**EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**ETOH:** Etanol

**EWC:** Contenido de agua en el equilibrio

**FBS:** Suero bovino fetal

**FTIR:** Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

**GA:** Glutaraldehído

**Gly:** Glicina

**Igs:** Inmunoglobulinas

**LbL:** *Layer-By-Layer*

**M.ALG-SF:** Microesferas de mezclas de alginato y fibroína de seda

**M.ALG-SF(EDC/NHS):** Microesferas de alginato y fibroína de seda entrecruzadas con EDC/NHS

**M.ALG-SF (GA):** Microesferas de alginato y fibroína de seda entrecruzadas con glutaraldehído

**M.ALG.MAGN:** Microesferas de alginato magnéticas

**M.ALG.MAGN. PLL-SF:** Microesferas de alginato magnéticas funcionalizadas con Poli-L-Lisina y fibroína de seda

**M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF:** Microesferas de alginato magnéticas funcionalizadas con precapa e injerto de fibroína de seda entrecruzadas con glutaraldehído (*a priori*)

**M.ALG.MAGN.PREC-SF (EDC/NHS):** Microesferas de alginato magnéticas funcionalizadas con precapa e injerto de fibroína de seda mediante la carbodiimida

**M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA):** Microesferas de alginato magnéticas funcionalizadas con precapa e injerto de fibroína de seda sobre la superficie de las mismas (*a posteriori*)

**M.ALG.MAGN.PREC:** Microesferas de alginato magnéticas funcionalizadas con precapa

**Medio completo MM:** RPMI 1640, suplementado con 10% FBS, 1% L-Glutamina, 1% P/S

**MGUS:** Gammapatía monoclonal de significado incierto

**MM:** Mieloma múltiple

**MMC:** Células de mieloma múltiple

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

**NHS:** N-hidroxisuccinimida

**NF-kB:** Factor nuclear kB

**P/S:** Penicilina/estreptomicina

**PCs:** Células plasmáticas

**PLL:** Poli-L-Lisina

**SF:** Fibroína de seda

**SUSP:** Suspensión celular

**TGA:** Análisis termogravimétrico

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. FIBROÍNA DE SEDA

### 1.1.1. Origen y química

La seda es una estructura natural de base proteica que puede obtenerse principalmente a partir de los capullos de varios tipos de orugas, gusanos de seda o arañas. La composición, estructura y propiedades de las sedas varían en función de la fuente de recolección (Ming *et al.*, 2021). La forma nativa de la seda consiste en un filamento proteico central conformado por fibroína de seda (SF) envuelta por una glicoproteína denominada sericina. Los porcentajes en masa de cada componente son de un 70-80% para la SF y un 20-30% para la sericina (Pritchard & Kaplan, 2011).

Mientras que la seda está conformada por dominios hidrofóbicos repetitivos y voluminosos, que están interrumpidos por pequeños grupos hidrofílicos (Li & Sun, 2022), la SF se compone de una cadena pesada de carácter hidrofóbico y una cadena ligera hidrófila y ligeramente elástica. En ambos casos el biomaterial resultante es de alto peso molecular, aunque la SF siempre es más ligera debido a que en la seda también hay sericina (Li & Sun, 2022; Kundu *et al.*, 2013). Centrándose en la SF, que es el polímero de interés del trabajo, las cadenas hidrófobas e hidrófilas están unidas entre ellas mediante un enlace disulfuro. La cadena pesada constituye la mayor parte de la secuencia y puede formar láminas  $\beta$  antiparalelas por su naturaleza hidrófoba (Figura 1A). Estas cadenas pesadas están formadas generalmente por repeticiones de un motivo dipeptídico Gly-X, es decir, en primera posición está presente la glicina (Gly) y en la segunda en orden de mayor a menor frecuencia se sitúan los aminoácidos: alanina (65%), serina (23%) tirosina (9%), valina, y treonina, principalmente (Figura 1B) (Kundu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2001).

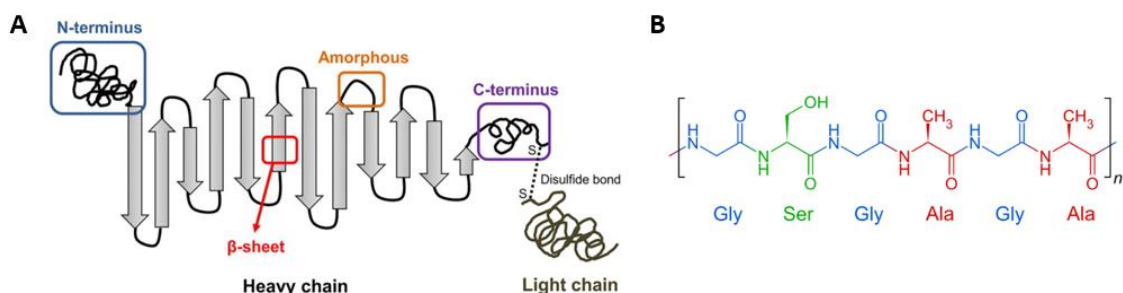


Figura 1. Estructura de la fibroína de seda. A) Representación de los dominios cristalinos (láminas  $\beta$ ) y amorfos de la SF, (Li & Sun, 2022). B) Estructura química de la SF, (Lancashire, 2011).

Otra propiedad relevante de la SF debida a su química es su potencial zeta. Este disminuye con el aumento del pH, empezando a ser negativo en torno a valores de pH 5. No obstante, la SF es estable cuando el pH de la solución está comprendido entre 6-9 (Ye *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2020). Esto demuestra que cuanto mayor sea el pH, la SF estará cargada más negativamente. En este trabajo la fibroína se ha empleado como polianión por este motivo.

### 1.1.2. Propiedades y aplicaciones de la fibroína de seda en el campo de la ingeniería tisular

La SF posee unas excelentes propiedades como biomaterial, pero la sericina provoca respuestas inmunológicas no deseadas (Rockwood *et al.*, 2011). Por lo tanto, no se puede usar la seda como biomaterial en crudo, sino que hay que separar la SF de la sericina. Para ello, la seda debe pasar por el proceso de desgomado, o *degumming* en inglés, que consiste en hervir los capullos de seda en condiciones alcalinas para eliminar la sericina (Wray *et al.*, 2011). La solución de SF preparada con sales neutras y obtenida tras el *degumming*, puede procesarse controlando su peso molecular, solubilidad, tamaño o forma (Nam & Hwan Park, 2001). Tras la eliminación de las sales mediante diálisis reversa, se obtiene la SF de bajo peso molecular, que puede liofilizarse

en forma de polvo, y se caracteriza por presentar un comportamiento de hidrólisis y de solubilización en agua (Cao & Wang, 2009; Nam & Hwan Park, 2001).

La estructura secundaria de la SF es determinante de muchas de sus propiedades como biomaterial. La secuencia aminoacídica altamente repetitiva le aporta homogeneidad, aspecto que manifiesta su importancia como soporte estructural (Kundu *et al.*, 2013). En comparación con otros biopolímeros, la principal ventaja de la SF es su excelente propiedad mecánica. Las interacciones entre las láminas hidrofóbicas y las regiones amorfas ofrecen una resistencia a la rotura, elongación y deformabilidad significativa, superando las prestaciones de los biomateriales sintéticos (Kundu *et al.*, 2013; Zuluaga-Vélez *et al.*, 2021). De hecho, sus excelentes propiedades han favorecido su uso durante siglos en suturas médicas y en la industria textil. Además, la SF en el campo de la ingeniería tisular se puede emplear en distintos ámbitos ya que es capaz de formar andamiajes porosos (*scaffolds* en inglés) altamente reproducibles, con arquitecturas como hidrogeles, fibras, esponjas o nanopartículas (Rockwood *et al.*, 2011).

En la actualidad, son estas excelentes propiedades mecánicas y su biocompatibilidad las que han impulsado el uso de la SF en biomedicina. La mayoría de trabajos optan por emplear la SF en forma de *scaffold* y usarla para diferentes propósitos. Por un lado, se ha empleado para regenerar tejidos exigentes, mecánicamente hablando, como el vascular, el óseo o el cartilaginoso (Li & Sun, 2022; Zuluaga-Vélez *et al.*, 2021). Por otro, se ha usado como agente liberador de fármacos, logrando que la FDA la apruebe para este objetivo (Pritchard & Kaplan, 2011). También se ha empleado la SF para fabricar andamiajes porosos sobre los que trabajar células tumorales. Reagan *et al.*, han centrado algunas de sus investigaciones en el desarrollo de soportes tridimensionales utilizando SF. En el trabajo de 2012 han sembrado células tumorales junto con células madre mesenquimales empleando implantes basados en seda para la generación de un entorno apto para la residencia de las mesenquimales y reclutamiento tumoral (Reagan *et al.*, 2012). En una revisión publicada dos años después describen el desarrollo de soportes tridimensionales o modelos que simulan el nicho biológico de la médula ósea para el estudio del mieloma múltiple (MM) (Reagan *et al.*, 2014). Con ello, han conseguido generar una plataforma fisiológicamente relevante para la investigación del crecimiento de células de mieloma múltiple (MMC) basada en *scaffolds* de SF.

## 1.2. MICROGELES

Los microgeles pueden definirse como un aglomerado de partículas poliméricas en medio acuoso. Están surgiendo como una potente herramienta en el campo de biomedicina, funcionando como plataformas funcionalizables de diversas maneras y capaces de simular la heterogeneidad tisular de los microentornos celulares (Caldwell *et al.*, 2020). Las microesferas que lo forman pueden tener un tamaño comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  hasta 1000  $\mu\text{m}$  y presentan en algunos casos, una estructura microporosa. Su consistencia es variable, según el material del que esté formado el microgel (Caldwell *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018).

Con frecuencia, los microgeles son esferas poliméricas biocompatibles capaces de retener sustancias en su interior (Caldwell *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2018). Además, presentan diferentes propiedades en función del tipo de biopolímero que se emplee para su formación. De hecho, los microgeles son una herramienta de la ingeniería tisular altamente modulable que ofrecen un sinnúmero de oportunidades, ya que, dependiendo de los materiales empleados, se puede controlar su tamaño, forma y propiedades. Aunque generalmente los materiales se escogen con el fin de asemejarse a la matriz extracelular (ECM), y, por tanto, al nicho biológico que se desee simular *in vitro* (Caldwell *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022).

### 1.2.1. Forma de obtención: microfluídica

La producción de micropartículas con las características requeridas ha sido durante mucho tiempo un gran desafío (Li *et al.*, 2018). Los métodos convencionales como la polimerización en

dispersión, el secado por aspersión o la polimerización en emulsión resultan en la generación de micropartículas con gran dispersión de tamaños y reproducibilidad limitada (Saralidze *et al.*, 2010).

Para hacer frente a estas limitaciones, se han explorado otras tecnologías para la fabricación controlada de micropartículas, siendo la técnica más versátil la microfluídica. La geometría de canales y la variación de flujos de diferentes soluciones inmiscibles, permite producir gotas redondeadas y con una distribución de tamaño estrecha y controlable (Li *et al.*, 2018). El control del tamaño y forma de las gotas se obtiene adaptando 4 propiedades clave: la tensión superficial entre las dos fases, la velocidad de flujo, la geometría de los canales que se utilicen para la formación de las microgotas y el material del que se fabrique el sistema (Dendukuri *et al.*, 2005).

Cuando se emplea la microfluídica en biomedicina, es la fase continua la que provoca la ruptura de la fase discontinua, de ahí sus nombres. Al romper el flujo discontinuo, se obtienen las micropartículas. Por lo tanto, la velocidad del flujo continuo debe ser suficiente como para provocar esta ruptura, y las paredes del sistema deben ser afines al medio continuo, para evitar la deformación de las gotas por contacto con los canales (Nisisako *et al.*, 2005). Además, la ruptura del flujo discontinuo en gotas viene determinada por la geometría de canales y su cruce. Las tres formas más comunes de uniones de canales se pueden apreciar en la Figura 2. En la configuración de *T-junction*, el canal de medio discontinuo conecta con el de la fase discontinua formando un ángulo recto. En la geometría *co-flow*, el canal de la fase discontinua desemboca en el eje longitudinal del de la fase continua. En la configuración *flow-focusing*, dos flujos perpendiculares al medio discontinuo fuerzan la formación de gotas debido al efecto de cizallamiento simétrico que ejerce la fase continua sobre la dispersa (Choe *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Es este último tipo de cruce el empleado en el presente trabajo.

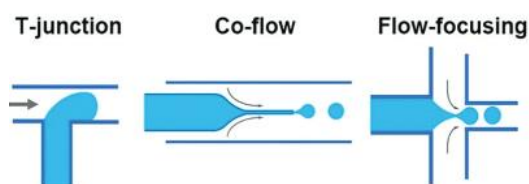


Figura 2. Modos de ruptura de gotas aplicados a distintas geometrías de canales, (Li *et al.*, 2018).

### 1.3. MATERIALES DE SOPORTE PARA LAS MICROESFERAS

Para la generación del modelo de enfermedad, el material base del microgel ha de ser biocompatible y tener la capacidad para ser funcionalizado, además de poder obtenerse a través de la microfluídica. Teniendo eso en mente, se escoge para este propósito el alginato, acompañado de nanopartículas de ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) para otorgarle nuevas propiedades a las microesferas.

#### 1.3.1. Alginato (ALG)

El alginato es un polisacárido aniónico e hidrófilo extraído de algas o algunas bacterias, que cuenta con una amplia gama de aplicaciones como biomaterial, entre las que destaca su uso como matriz de soporte, la regeneración tisular o la diferenciación y proliferación de osteoblastos (Sahoo & Biswal, 2021). Esta popularidad se debe a unas excelentes propiedades en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad, no antigenicidad y capacidad quelante (Russo *et al.*, 2007; Sun & Tan, 2013). Además, al ser el material biosintetizado más abundante después de la celulosa, se puede emplear sin suponer elevados costes.

El interés de este biopolímero para las microesferas del trabajo radica en sus propiedades gelificantes, determinadas por su química. Y es que el alginato posee una estructura química de copolímero lineal, que consta de dos monosacáridos. Estos son el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y



el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), que están unidos de manera no secuencial en múltiples combinaciones y proporciones mediante enlaces glicosídicos 1 $\rightarrow$ 4 (Russo *et al.*, 2007; Sahoo & Biswall, 2021). Una de estas posibles combinaciones puede verse en la Figura 3.

El alginato de sodio puede entrecruzarse con iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos iones interactúan con bloques de gulurónico formando interacciones iónicas entre diferentes cadenas. De esta manera, las soluciones de alginato pueden gelificar por interacción electrostática con polielectrolitos, en presencia de cationes divalentes o mediante la bajada de pH por debajo del  $pK_a$  de los residuos urónicos. De esta manera, el alginato al contener estos iones (por ejemplo, al estar dispersado en carbonato cálcico) reticula y se entrecruza, y al sumergirse en un baño con pH ácido, se provoca la disociación catiónica. (Russo *et al.*, 2007; Sahoo & Biswal, 2021).

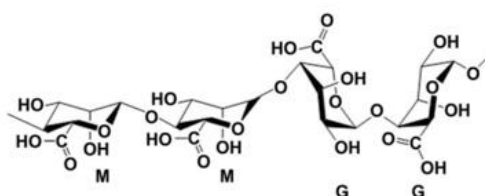


Figura 3. Una de las posibles combinaciones de formación de la estructura química del alginato, (Sun & Tan, 2013).

### 1.3.2. Nanopartículas de ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

Se trata de un tipo de nanopartículas magnéticas que cuenta con propiedades como el superparamagnetismo y la alta magnetización, como consecuencia del tamaño finito y los efectos superficiales (Andrade *et al.*, 2020). Durante los últimos años, su uso se está viendo incrementado en el sector biomédico gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad química, inocuidad y bajo coste (Ganapathe *et al.*, 2020). Otro punto a favor de su uso en biomedicina es que la ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) no retiene la magnetización tras la eliminación del campo magnético aplicado, es decir las nanopartículas vuelven casi de inmediato a su estado basal. Esto permite su uso en materiales para dotarlos de sus excelentes propiedades magnéticas sin que los materiales de base tuvieran ninguna. Así, pueden ser utilizadas en distintos ámbitos de la biomedicina, como es el diagnóstico y la terapia oncológica, la administración y liberación de fármacos, técnicas de bioimagen (Andrade *et al.*, 2020; Ganapathe *et al.*, 2020), además de su uso para la creación de materiales de protección contra la radiación electromagnética (Lesbayev *et al.*, 2017). La propuesta de uso en este trabajo es facilitar la manipulación de las microesferas, y conseguir en un futuro la separación del microgel de las células en suspensión para analizar unas y otras por separado, por ejemplo, con técnicas como la citometría de flujo.

## 1.4. FUNCIONALIZACIONES

En muchas ocasiones, cuando se combinan diferentes biopolímeros mediante mezclas o por entrecruzamientos se adquieren propiedades físicoquímicas mejoradas con respecto a un sustrato desnudo (Grabska-Zielińska *et al.*, 2021). El uso de la funcionalización de superficies puede servir de base para imitar el comportamiento *in vivo*, ofreciendo a las células un sustrato más biomimético o interesante para la investigación. De hecho, se puede estudiar la interacción de los elementos individuales que componen la ECM con las células y ver si un componente concreto tiene repercusión sobre el comportamiento celular. Un ejemplo son los estudios de resistencia a fármacos en MM (Clara-Trujillo *et al.*, 2022; Marín-Payá *et al.*, 2021).

Existe un amplio abanico de técnicas de funcionalización de superficies, dependiendo del material a incorporar al constructo y la forma de hacerlo. Estas se dividen en técnicas de

funcionalización superficial físicas y químicas. En los métodos físicos, las interacciones entre el material de interés y el sustrato son de tipo electrostático, hidrofóbico o basadas en puentes de hidrógeno, por lo que son más débiles que los métodos químicos, basados en enlaces covalentes generalmente (Rana & Leena, 2016). Pese a que hay gran variedad de métodos físicos y químicos, se van a explicar, por un lado, los injertos mediante enlaces covalentes, y por otro, el método de la deposición de polielectrolitos, también denominada *Layer by Layer* (LbL) ya que son las empleadas en este trabajo.

#### **1.4.1. Injertos**

Para el recubrimiento de materiales no conductores como los biopolímeros con materiales como la SF, se han descrito procedimientos de pretratamiento y de postratamiento. Los primeros consisten en la modificación físico-química de la superficie objetivo mediante su activación con metanol/agua, plasma de oxígeno o ultravioleta/ozono. Los postratamientos se basan en la combinación de temperatura y exposición a metanol/vapor de agua o radiación ultravioleta, lo que resulta en transiciones estructurales de la SF a su forma cristalina, en la que es más estable. Se ha visto que estos tratamientos son efectivos para mejorar la adhesión de las películas de SF a distintas superficies (Arkhangelskiy *et al.*, 2021).

A menudo, se recurre también al injerto de carácter químico. Esto tiene razones muy variadas, que van desde la difícil solubilidad del polímero de interés en agua, al tamaño de molécula, pasando por el tiempo de trabajo para lograr una cantidad de deposición aceptable para el usuario (Arkhangelskiy *et al.*, 2021; Grabska-Zielińska *et al.*, 2021).

Si bien es cierto que existe una amplia cantidad de agentes de injerto proteico como el genipín o el 3-Aminopropiltriethoxisilano (Grabska-Zielińska *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2017), en este trabajo se han empleado los injertos directos con glutaraldehído (GA) y con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS).

##### **1.4.1.1. Injerto directo con GA**

El glutaraldehído, un dialdehído lineal de 5 carbonos, es uno de los compuestos más ampliamente empleados para el entrecruzamiento de proteínas debido a su disponibilidad comercial, bajo costo y elevada reactividad (Migneault *et al.*, 2004). El GA reacciona rápida e irreversiblemente con grupos amina a un pH comprendido en el rango 7-9, y es más eficiente que otros aldehídos de la familia en la generación de enlaces químicamente estables. Puede funcionar en otras franjas de pH de manera reversible (Okuda *et al.*, 1991). Sin embargo, su química ha sido durante varias décadas bastante controvertida, a causa de que su simple estructura no explica la elevada complejidad en disolución acuosa y alta reactividad (Migneault *et al.*, 2004).

Las cadenas laterales de aminoácidos más reactivas son los nucleófilos. El GA puede reaccionar con grupos funcionales amina, tiol, fenol e imidazol, todos presentes en las proteínas y aminoácidos. Esto significaría, que aparte de reaccionar y unirse a proteínas, puede unirse con aminoácidos independientes, como la lisina, histidina, serina, glicina, cisteína, prolina, arginina, además de los aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) (Hopwood *et al.*, 1970). El GA al encontrarse en disolución puede formar polímeros de distinta masa molecular capaces de reaccionar con los grupos  $\epsilon$ -amino libres no protonados ( $-NH_2$ ) expuestos por las cadenas laterales de los aminoácidos para que se dé una reacción de adición nucleofílica que produce el entrecruzamiento (Figura 4A) (Migneault *et al.*, 2004; Walt & Agayn, 1994).

El GA a pesar de su citotoxicidad, se ha empleado para injertar, reticular o entrecruzar SF con otros biomateriales, como la gelatina, el quitosano, el poliácido láctico-co-glicólico o el polivinil alcohol debido a su elevada reactividad (Pillai *et al.*, 2016.; Qiao *et al.*, 2017).

#### 1.4.1.2. Injerto con EDC/NHS

El EDC es un agente de entrecruzamiento de proteínas popularmente utilizado. Con frecuencia, los protocolos de entrecruzamiento con EDC incluyen NHS. Esto permite una mayor eficiencia de acoplamiento de dos proteínas en dos pasos y productos intermedios reactivos con amina más estables sin afectar a los grupos carboxílicos de la segunda proteína (Bart *et al.*, 2009).

El EDC activa los grupos carboxilo y forma un éster como subproducto, O-acilsourea. El éster es susceptible al ataque nucleofílico por aminas primarias, reacción que se da espontáneamente formando un enlace amida estable (Ducker *et al.*, 2008).

Al igual que el GA, la química de la carbodiimida se ha empleado para entrecruzar y reticular fibroína de seda con otros biopolímeros como el ácido hialurónico, el colágeno, el quitosano o la propia SF (Yan *et al.*, 2013). A diferencia del GA, este agente entrecruzador no ha de ser inactivado porque no resulta citotóxico para las células.

#### 1.4.2. Layer-By-Layer (LbL)

La técnica elegida para la funcionalización de las microesferas de este trabajo es el *Layer by Layer* de tipo inmersivo. Se trata de un ensamblaje capa por capa de películas delgadas que ha sido de gran interés durante los últimos años debido a la posibilidad de aplicación sobre el recubrimiento de muchos materiales y de poder controlar el espesor de la película fabricada (Watanabe *et al.*, 2020). El mecanismo de acumulación de multicapas de LbL se impulsa mediante la atracción electrostática entre los materiales constituyentes (capas) con carga opuesta. La adsorción alterna de polielectrolitos catiónicos y aniónicos conduce a la formación de los ensamblados multicapa. En el tipo inmersivo específicamente (Figura 4) se comienza sumergiendo el sustrato en una solución de carga opuesta. Luego, se introduce el sustrato con la primera capa en el polielectrolito de carga opuesta a la primera capa, para depositar la siguiente. Este proceso se repite hasta obtener el número de capas deseado intercalando entre los dos polielectrolitos de carga opuesta lavados para eliminar el reactivo no unido (De Villiers *et al.*, 2011).

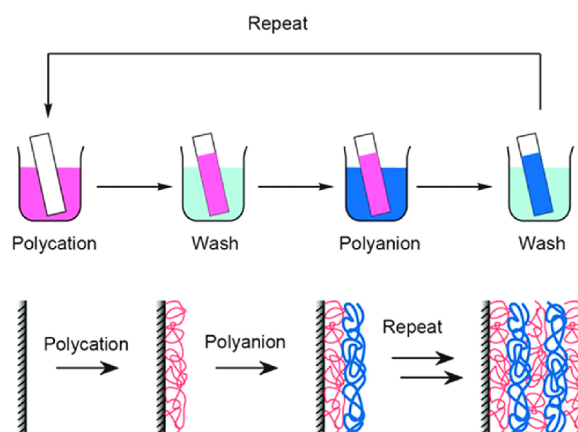


Figura 4. Representación esquemática del proceso LbL, (Watanabe *et al.*, 2020).

En el presente trabajo, se ha empleado esta técnica para recubrir superficialmente las microesferas de alginato magnéticas y conferirles una mayor estabilidad en cultivo. Los materiales empleados en este trabajo para esta funcionalización han sido la poli-L-Lisina (PLL), el condroitín sulfato (CS), y la propia SF.

La PLL es un polipéptido sintético catiónico con el aminoácido lisina como unidad de repetición (Figura 5A). Por cada residuo de lisina cuenta con un ácido bromhídrico, que permite que la PLL sea soluble en agua en su forma cristalina. Se usa ampliamente como recubrimiento para

promover la unión a superficies (Nimesh, 2013). El uso de la PLL en otros LbL está muy estudiado, sobre todo en combinación con el alginato, debido a su alta afinidad con él y la capacidad de retención de este (Fu *et al.*, 2014). A un pH neutro contiene grupos hidrofílicos cargados positivamente, por ello para este trabajo se ha utilizado como policación.

El condroitín sulfato o sulfato de condroitina (CS) es el componente principal del cartílago articular. Se trata de un heteropolisacárido aniónico de la familia de los glicosaminoglicanos sulfatados. A nivel estructural, el CS está compuesto de unidades repetitivas de disacárido de ácido D-glucurónico (GlcA) unido a  $\beta$ -N-acetil-galactosamina (GalNAc) que contiene un grupo sulfato en diferentes posiciones de carbono (Figura 5B), que dividen al CS en cinco subgrupos. Este biopolímero es biodegradable y biocompatible. Además, posee actividad antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral, anticoagulante y antitrombogénica (Mikami & Kitagawa, 2013). El CS a un pH neutro contiene grupos hidrofílicos cargados negativamente, por ello para este trabajo se ha utilizado como polianión.

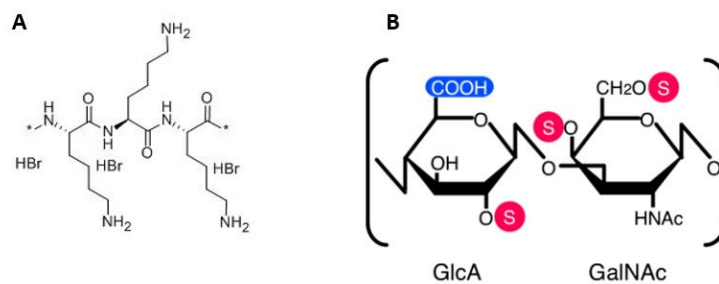


Figura 5. A) Estructura química de la PLL (Santa Cruz Biotechnology); B) Estructura del CS con grupos sulfato en distintas posiciones, (Mikami & Kitagawa, 2013).

## 1.5. MIELOMA MÚLTIPLE

### 1.5.1. Origen, clasificación y epidemiología

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia hematológica maligna que afecta a las células plasmáticas (PCs) del sistema inmunitario. Las PCs proceden de la diferenciación terminal de los linfocitos B, y su función principal está relacionada con la inmunidad humoral mediante la secreción de inmunoglobulinas (Igs) para la protección del organismo (Kyle & Rajkumar, 2008)(Figura 6). El MM se engloba dentro de una serie de patologías denominadas gammapatías monoclonales. En ellas, las PCs proliferan de manera descontrolada produciendo anormalmente Igs iguales entre sí, que en la mayoría de los casos, son de un único tipo, que reciben el nombre de proteína monoclonal o M (Rivas & Álvarez, 2006; Kumar *et al.*, 2017).

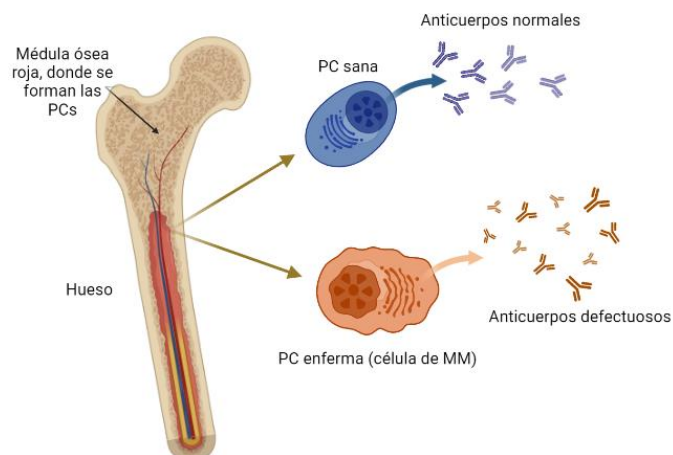


Figura 6. Comparación entre células plasmáticas sanas y afectadas por Mieloma Múltiple. Realizado con BioRender.

Esta patología evoluciona desde una condición premaligna conocida clínicamente como gammapatía monoclonal de significado incierto con un riesgo de progresión de aproximadamente 1% al año. En MGUS, la mayoría de la población que la padece es asintomática y no es diagnosticada. Existe una etapa intermediaria entre MGUS y MM, denominada Mieloma Múltiple Latente, asociada con un riesgo de progresión del 10% anual (Rajkumar & Kumar, 2016). El MM representa el 1% de todos los diagnósticos de cáncer, y es la segunda neoplasia maligna más común (seguida del linfoma) (Kumar *et al.*, 2017), siendo más frecuente en la población afroamericana que en la caucásica, y más común en hombres que en mujeres (Anand-Padala *et al.*, 2021). Acorde con el último informe de GLOBOCAN sobre el MM presentado en 2020, la incidencia está yendo en aumento, y actualmente se sitúa en 8 y 5 casos por cada 100.000 habitantes (hombres y mujeres, respectivamente) (GLOBOCAN, 2020).

### 1.5.2. Bases moleculares y evolución clonal

Los tumores de MM conllevan al aumento o desregulación de la expresión de las ciclinas D1, D2 y D3 (Chiecchio *et al.*, 2009). En el 55% de los casos, se generan mediante una vía oncogénica no hiperploide, que se asocia con una alta prevalencia de translocaciones y deleciones cromosómicas en el locus IgH en las regiones 14q32 y 13q, respectivamente (Bergsagel *et al.*, 2005). La otra ruta de adquisición tumoral descrita, de carácter hiperploide, se relaciona con la aparición de múltiples trisomías en cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19), y se ha observado en aproximadamente el 45% de los pacientes (Bergsagel *et al.*, 2005). Se ha dado especial importancia a una deleción en el cromosoma 13, sobre todo en los casos que muestran translocaciones relacionadas con la ciclina D (Chiecchio *et al.*, 2009).

Los análisis de expresión génica muestran un perfil muy similar entre MGUS y MM. Esto se explica porque las mutaciones están presentes desde los estadios iniciales de la enfermedad ((Furukawa & Kikuchi, 2020). La diferencia genética mejor caracterizada entre ambos estadios se da en los genes RAS, extremadamente raras en MGUS y presentes en el 20-30% de los pacientes recién diagnosticados de MM (Chng *et al.*, 2011). En los estadios más avanzados de la enfermedad, la hipometilación del ADN provoca inestabilidad genómica, acelerando la progresión de la enfermedad hacia etapas terminales. Esto origina lesiones extramedulares acompañadas de la expresión constitutiva del factor nuclear Kb (NF-Kb) y deleciones en genes que codifican para inhibidores del mismo (Furukawa & Kikuchi, 2020).

Recientemente, se han descrito otras moléculas diferenciadoras que se expresan en MM y no en pacientes con MGUS o sanos, como la sobreexpresión del estimulador de linfocitos B y su receptor; la activación de la molécula de adhesión CD56 o la secreción masiva de interleucina-6. Estas acciones provocan la hiperactivación de las células del estroma desequilibrando el balance antiapoptótico de las PCs y contribuyendo a la expansión clonal descontrolada (Allegra *et al.*, 2019). Gracias a las técnicas de secuenciación de alto rendimiento se han podido identificar muchos genes alterados en el MM, como KRAS, BRAF, TP53 o IRF4 (Furukawa & Kikuchi, 2020).

Durante las primeras fases del MM, las PCs se expanden clonalmente, y a medida que se acumulan mutaciones va avanzando la enfermedad. Esta evolución clonal presenta una complejidad superior a un patrón lineal (donde la patología empieza en un clon ancestral y mediante mutaciones secuenciales va evolucionando). Se ha descrito que en el MM hay presente cierto grado de heterogeneidad dentro de los clones tumorales de los pacientes, siguiendo un patrón de evolución más ramificado, donde múltiples clones generan otros nuevos simultáneamente, entre los que se ha observado dominancia y distinto comportamiento con respecto a otros clones (Kuman *et al.*, 2017). Este aspecto repercute directamente sobre la respuesta a las terapias farmacológicas, ya que los tratamientos producen una modificación de la arquitectura clonal. De esta manera, los clones más resistentes, exceden a los demás, acumulándose en el microambiente de la médula ósea, favoreciendo la progresión y recaída de

MM. Este efecto de dominancia y resistencia supone la barrera principal en la búsqueda de tratamientos efectivos para la enfermedad (Furukawa & Kikuchi, 2020; Kumar *et al.*, 2017; Marín-Payá *et al.*, 2021).

### 1.5.3. Diagnóstico y cuadro clínico

La proliferación monoclonal descontrolada de las PCs y la producción exagerada de proteínas M genera daños en la médula ósea. Estos daños se producen porque este comportamiento celular anómalo activa el NF- $\kappa$ B, que desencadena citopenia y huesos frágiles y quebradizos. Esto a su vez conduce a la destrucción del hueso a través de lesiones líticas que predisponen a un cuadro clínico caracterizado por dolor, fracturas, problemas de movilidad, elevados niveles de creatinina sérica, pérdida de peso, fatiga, anemia y calcinosis (Anand-Padala *et al.*, 2021). Además, provoca acidosis tubular renal tipo II e insuficiencia renal en dos de cada tres casos de MM debido a la acumulación de la proteína M, que incrementa la viscosidad sanguínea. De hecho, una de las pruebas diagnósticas que se realizan a los pacientes es el recuento de proteína M en sangre o en orina que en más del 50% de los casos es de tipo IgG, seguidos por IgA e IgD (Anand-Padala *et al.*, 2021; Brigle & Rogers, 2017).

Los criterios de diagnóstico actualizados por el Grupo Internacional de Trabajo de Mieloma han representado un impacto en el pronóstico de la enfermedad. Además de los signos comentados, la nueva definición de MM activo requiere de una cantidad de PCs clonales en la médula ósea superior al 10%. Se han establecido biomarcadores característicos (como el ratio de cadenas ligeras libres en suero o el porcentaje de PCs clonales) que han permitido definir unos límites y rangos de concentraciones para establecer el diagnóstico (Anand-Padala *et al.*, 2021; International Myeloma Foundation, n.d). No obstante, la edad media de diagnóstico es bastante tardía (a los 69 años) ya que la acumulación de mutaciones requiere décadas. Esto explica que la enfermedad solo sea visible a nivel clínico en adultos mayores. Se han descrito otros factores de riesgo tales como la dieta, la obesidad, el alcohol o tabaco, exposición a pesticidas o radiaciones ionizantes y en ocasiones predisposición genética (Alexander *et al.*, 2007).

## 1.6. PLATAFORMAS DE CULTIVO Y MODELOS DE ENFERMEDAD

El MM se ha estudiado tradicionalmente en sistemas de cultivo monocapa o 2D *in vitro*. Sin embargo, la tendencia actual se dirige cada vez más al uso de cultivos tridimensionales (3D) con uno o varios tipos celulares. Estos modelos 3D incorporan tanto células, como componentes de la ECM, lo que hace que sean capaces de proporcionar un microambiente más similar al que se encuentra *in vivo*. De hecho, existen evidencias de que los cultivos bidimensionales no resultan representativos de la organización heterotípica y tridimensional del tejido específico (Ferrarini *et al.*, 2017). Además, existe discrepancia entre los resultados de los ensayos preclínicos, obtenidos *in vitro* en 2D, y clínicos. El equipo de de La Puente atribuye esta diferencia al fracaso de los cultivos 2D al reproducir las condiciones *in vivo* (de La Puente *et al.*, 2015).

Otra ventaja de los cultivos 3D es que representan una alternativa más rápida, respetuosa con los animales y económica a la investigación con modelos animales. Esto se debe a que simulando mejor el entorno *in vivo*, las pruebas realizadas en plataformas de cultivo se realizan con productos más refinados, reduciendo costes animales y monetarios. Esto incrementa el interés de diseñar plataformas tridimensionales biomiméticas que reproduzcan el nicho biológico lo mejor posible con el fin de emplearse como modelos de enfermedad más realistas (Clara-Trujillo, *et al.*, 2022; Ham *et al.*, 2019; Marín-Payá *et al.*, 2021).

## 2. OBJETIVOS

Ante la necesidad de estudiar los mecanismos de generación de resistencia por las células de Mieloma Múltiple a los tratamientos actuales, en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV ha surgido una línea de investigación basada en la generación de modelos de enfermedad para el Mieloma Múltiple utilizando como base microgeles biomiméticos, dentro de la que se enmarca este proyecto.

En este sentido, el principal objetivo del presente TFG ha sido el desarrollo de microgeles funcionalizados con fibroína de seda y realizar una prueba de concepto de su aplicación en el cultivo de células tumorales de Mieloma Múltiple. Para conseguirlo se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de la síntesis de microesferas poliméricas mediante microfluídica, además de establecer una cantidad óptima de nanopartículas magnéticas para el microgel.
- Funcionalización superficial de las microesferas mediante el uso de la técnica *Layer-By-Layer*, de deposición de polielectrolitos.
- Desarrollo de un protocolo que permita el injerto directo de la fibroína de seda sobre la superficie de las microesferas.
- Caracterización morfológica y fisicoquímica de los recubrimientos, con especial interés en el injerto de fibroína de seda.
- Validación de la plataforma de cultivo propuesta mediante el análisis de la viabilidad y proliferación celular de la línea celular de mieloma múltiple RPMI 8226.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Por un lado, para la producción de microesferas de alginato magnéticas se utilizó alginato sódico de alga marrón (Sigma-Aldrich®), carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ , Scharlab®), nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Ferrotec®), aceite de oliva virgen extra comercial (La Masía), lecitina de soja (Guinama®) y ácido acético de Scharlab®. Para su recogida y limpieza se empleó cloroformo (Scharlab®) y agua desionizada (obtenida de la grifería del laboratorio), y para su almacenaje etanol (ETOH) 70%, obtenido a partir de etanol 98% (Scharlab®). Para la funcionalización de las microesferas se utilizó poli-L-lisina-hidrobromida (PLL), condroitín sulfato (CS), cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ), N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS – 98%), glicina (Gly) todos ellos de Sigma-Aldrich®, glutaraldehído (GA) al 25%, buffer Tris 1M pH 7,6 ambos de Scharlab® y fibroína de seda (SF, suministrada por los compañeros del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de Madrid). Para el ajuste del pH de las disoluciones se ha utilizado ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), ambas de Scharlab® a bajas concentraciones. Mientras, para la síntesis de microesferas de fibroína, se ha empleado además de SF y lecitina de soja comentadas previamente, etanol 98% (Scharlab®), ácido oleico y metanol, ambos de Sigma-Aldrich®. Para la generación de microesferas de alginato y fibroína se utilizaron los mismos componentes que para las microesferas de alginato magnéticas, a excepción de las nanopartículas magnéticas, y añadiendo la fibroína de seda.

En el ensayo de estabilidad se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Scharlab®). En el cultivo celular se empleó la línea celular RPMI 8226 de Mieloma Múltiple (ATCC CCL-155). Estas células se sembraron en medio RPMI 1640



suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% v/v y penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% v/v, ambos de Fisher™. Además, se añadió L-glutamina al 1% v/v (Lonza) ya que el medio RPMI 1640 no incluía este suplemento. Para la expansión de células se utilizaron Frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> (T25), y para el cultivo del microgel se emplearon criotubos de 2mL con tapón de rosca (ThermoFisher™). Para el ensayo de citotoxicidad celular se empleó el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS, CellTiter 96® Cell Proliferation Assay de Promega).

### 3.2. SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE ALGINATO MAGNÉTICAS (M.ALG.MAGN)

Para producir las microesferas de alginato magnéticas (M.ALG.MAGN) se han empleado sistemas de microfluídica, como el que se muestra en la Figura 7, que han sido elaborados en los laboratorios del CBIT por el compañero Luis Amaro Martins Ribeiro.

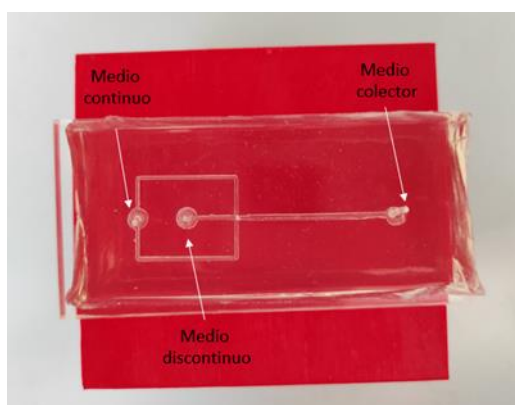


Figura 7. Sistema de microfluídica empleado para la síntesis de microesferas.

#### 3.2.1. Preparación de las disoluciones

Por un lado, se pesaron las cantidades necesarias de alginato y carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) para tener la concentración adecuada de fase dispersa.

El medio discontinuo estaba compuesto por alginato,  $\text{CaCO}_3$  y nanopartículas de ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), todo ello disuelto en agua. Por un lado, se preparaba una disolución de alginato pesándolo en la balanza de precisión Mettler Toledo, modelo XS104 para que quedara al 3% p/v en agua miliQ (obtenida del equipo Direct-Q-3 System Millipore). Se dejaba en agitación magnética a 60-70°C durante al menos 1h. Por otro lado, se preparaba una dispersión de carbonato cálcico 0,5M en agua miliQ pesando la masa de carbonato cálcico necesaria en la balanza de precisión. Para mezclar el carbonato con el agua, era necesario dejar la dispersión en un baño de ultrasonidos durante al menos media hora porque es insoluble en esta. Una vez disuelto el alginato y dispersado el  $\text{CaCO}_3$ , se juntaban dos volúmenes iguales de estas disoluciones para lograr la concentración final de interés: 1.5% p/v en alginato y 0,25M de  $\text{CaCO}_3$ . Se dejaba esta mezcla en el dispersador de alto rendimiento ULTRA-TURRAX T 25 digital (IKA) a una velocidad de 3000-4000 rpm.

De manera paralela, se preparaba la dispersión de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en 1 mL de etanol puro. Se ensayaron 3 concentraciones de ferrita, explicadas en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos, siendo la óptima al 5% p/p alginato. Los protocolos de manejo de las nanopartículas en el laboratorio incluyen pesar la cantidad necesaria en campana de extracción de gases, y a su vez, dentro de una cabina de metacrilato previamente humedecida. Las nanopartículas se añadieron al mililitro de etanol y se dejó la mezcla durante 10 minutos en el baño sonicador para evitar la formación de agregados. Cuando la mezcla estuvo lista, con una Pasteur se añadió el



mililitro de disolución a la mezcla de alginato y  $\text{CaCO}_3$ . Esta disolución se quedaba agitando en el ULTRA-TURRAX a una velocidad cercana a 4000rpm durante al menos 4h antes de comenzar la síntesis de microesferas para dispersar al máximo las nanopartículas y homogeneizar el medio discontinuo final.

Luego, el medio continuo se componía de lecitina de soja (surfactante) 1% p/p de aceite de oliva, es decir, pesando 1g de lecitina por cada 100g de aceite. Esta mezcla se pesaba en la balanza (sartorius Entris) y se homogenizaba en un agitador magnético dentro de un recipiente Pyrex® cerrado durante al menos 10 minutos. Finalmente, el medio colector tenía la misma composición que el medio continuo, pero añadiéndole ácido acético al 2% v/v para bajarle el pH. Esto significa que por cada 50g de medio continuo se añadía 1mL de acético. Para finalizar, el medio colector se homogenizaba en agitación magnética durante al menos 10 minutos.

### **3.2.2. Síntesis de las microesferas por microfluídica**

En este caso, el medio continuo está conectado al sistema por la primera entrada y el discontinuo por la segunda. La tercera salida del sistema conecta con un tubo coaxial por el que circula el medio colector (Figura 7). Al bajar el pH del interior de la microesfera se disocia el  $\text{CaCO}_3$  contenido en las micropartículas, liberando el calcio que gelificará la microesfera. Este trayecto ayuda a que las microesferas se reticulen sin agregarse y lleguen al vaso colector ya entrecruzadas.

Más concretamente, se emplean dos bombas de acople de jeringuillas programables para microfluídica. Se usó una jeringuilla de 6mL para cargar el medio discontinuo y otra de 60mL para el medio continuo, cuyos diámetros internos eran de 12,3mm y 29,2mm, respectivamente, medidos con el pie de rey electrónico. La jeringa con el medio continuo se acoplaba a la bomba NE-1000 Higher Pressure Programmable Single Syringe Pump (New Era Instruments), y la jeringuilla con el discontinuo a Standard PHD ULTRA™ CP Syringe Pump (Harvard Apparatus). Sobre un soporte universal se colocaba el vaso unido al tubo coaxial y se llenaba de medio colector. Una vez que el montaje estaba listo, se configuraron los valores de diámetro y flujo para los medios continuo y discontinuo en ambas bombas. Se trabajaron distintos valores de flujo hasta que se encontraron los óptimos, que se han establecido en 65,0mL/h para el medio continuo y 1,55mL/h para el discontinuo, como se explica en el apartado 4.1 de Resultados y Discusión. En la salida de las jeringuillas se colocaban dos agujas conectadas a tubos de teflón de un grosor de 500 $\mu\text{m}$  que son los que se conectaban al sistema de microfluídica y permitían la entrada de ambas fases. Primero se llenaba el sistema de microfluídica de medio continuo para evitar que el discontinuo se agregara a las paredes. Luego se iniciaba el flujo del medio discontinuo teniendo especial precaución en no dejar aire en el interior del sistema. Para evitar la separación de fases en el medio discontinuo debido al peso de las nanopartículas magnéticas, se aplicaban campos magnéticos sobre la jeringuilla de medio discontinuo. Estos campos podían aplicarse con imanes sencillos o colocando agitadores magnéticos justo sobre la jeringuilla. El montaje para la obtención de microesferas de alginato magnéticas se representa en la Figura 8.

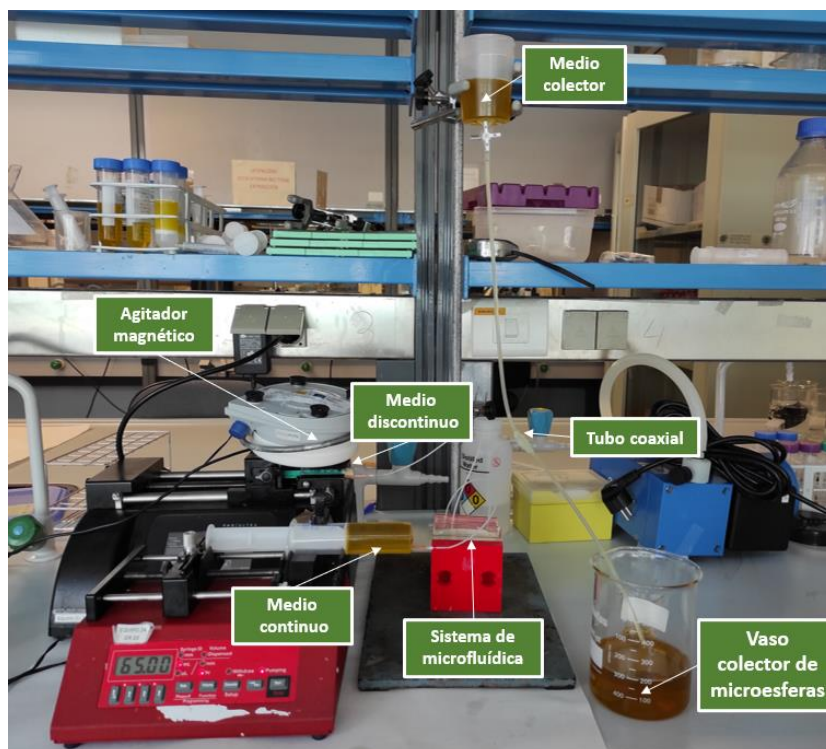


Figura 8. Montaje para la síntesis de microsferas de alginato magnéticas.

Una vez finalizada la síntesis, es momento de recuperar las microsferas del medio colector y eliminarlo de la superficie de estas. Para ello, se acoplaba un tamiz de  $60\mu\text{m}$  a un facilitador para hacer vacío y esto a su vez a un Falcon de 50mL. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se hacía pasar la solución colectora con las microsferas por el filtro, donde quedaban retenidas. Una vez eliminado el grueso del aceite, las microsferas recibían, en campana de extracción de gases, varios lavados de poco volumen de cloroformo para retirar los restos de aceite que pudiesen quedar entre y sobre ellas. Por último, las microsferas se lavaban con agua desionizada varias veces aprovechando de nuevo el tamiz, se secaban y se almacenaban en etanol 70% (ETOH), hasta su posterior uso, con la ayuda de un pincel de silicona.

### 3.3. OBTENCIÓN DE MICROESFERAS DE FIBROÍNA DE SEDA

De manera similar a la descrita en el apartado 3.2.2., la síntesis de microsferas de fibroína de seda se llevó a cabo mediante microfluídica, a partir del protocolo de Breslauer *et al.*, 2010. Como fase discontinua, se utilizó una disolución acuosa de SF,  $\text{CaCl}_2$  1M, Tris 50 mM, a una concentración de 8mg/mL. La solución de SF se preparaba siguiendo las instrucciones proporcionadas por los compañeros del CTB de Madrid. Inicialmente se pesaba la masa de SF liofilizada necesaria para obtener la concentración deseada, luego se añadía la masa de  $\text{CaCl}_2$  para lograr la concentración 1M y todo ello se disolvía en agua miliQ con buffer Tris 50mM. Se dejaba en agitación magnética durante 1h a 600 rpm y seguido de ello se centrifugaba 20 minutos a 4000 rpm, usándose el sobrenadante para conseguir una disolución homogénea.

Como fase continua se empleó una mezcla compuesta por ácido oleico (75% v/v) a la que se le añadió lecitina de soja (2%) como surfactante, y metanol (25% v/v). Las microsferas se dejaron caer a un baño conformado por una solución alcohólica, a base de metanol o etanol y se mantuvieron *overnight*.

### 3.4. SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE MEZCLAS DE ALGINATO Y FIBROÍNA DE SEDA (M.ALG-SF)

Buscando introducir SF en las microesferas de alginato de este trabajo, se modificó el protocolo descrito por Ming et al. (Ming *et al.*, 2015). Se empleó el mismo sistema de microfluídica y montaje que para la obtención de M.ALG.MAGN descrito en el apartado 3.2.

Lo que se pretende es obtener microesferas por microfluídica compuestas por mezclas de ALG y SF. Para ello el medio discontinuo se constituyó por una mezcla de ALG y SF, a unas concentraciones finales de 1.5% p/v y 0,8% p/v, respectivamente (sin emplear nanopartículas magnéticas). La disolución acuosa de alginato se preparó inicialmente al 6% p/v y tras 1 día en agitación magnética se juntó con un volumen equivalente de disolución dispersada de  $\text{CaCO}_3$  (quedando en este momento al 3% p/v en alginato y al 0,5M en  $\text{CaCO}_3$ ). Mientras la mezcla de alginato y  $\text{CaCO}_3$  se mezclaba, se procedía a la preparación de una disolución acuosa de SF a una concentración de 1.6% p/v. Para ello se dejó en agitación magnética durante 1h a 600 rpm y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante, se filtró y se juntó con un volumen equivalente de la mezcla de alginato con  $\text{CaCO}_3$ . Esta disolución se dejó en agitación durante 30 minutos, quedando en las concentraciones deseadas.

El medio continuo y el medio colector se prepararon como se explica en el apartado 3.2.1. A continuación, se procedió a la síntesis y recogida de microesferas, de manera similar a lo explicado en el apartado 3.2.2.

Tras la recogida de las microesferas, con el fin de reticular la SF, se mantuvieron *overnight* en una disolución al 7,5% p/p de EDC/NHS en una proporción 2/1, en etanol 95% v/v, siguiendo el protocolo de Liu *et al.*, (2012) (M.ALG-SF(EDC/NHS)). También se probó a entrecruzar estas microesferas en una disolución al 2% p/v de GA (M.ALG.SF(GA)), y una posterior inactivación *overnight* con Gly 0,1M.

### 3.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE FERRITA EN LAS MICROESFERAS DE ALGINATO

A las microesferas de alginato 1.5% p/v se les ensayaron tres concentraciones de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  distintas para conseguir darles una funcionalización magnética. Se probaron los porcentajes 2,5% , 5% y 10% p/p de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con respecto al peso de alginato. Se acotó a estos tres valores la búsqueda por dos razones, la primera, el uso que se va a hacer del magnetismo y la segunda, el manejo de las microesferas. Para decidir cuál de los tres porcentajes se empleaba en el resto del trabajo, se diseñó este experimento basado en la velocidad de sedimentación.

Primero, se prepararon las muestras a una misma concentración (40% microesferas en agua miliQ) y se dispersaron durante 15 minutos. Luego, se prepararon los viales donde se mediría la velocidad de sedimentación. En estos se marcaron 5cm desde la base del vial, luego se situó sobre un soporte universal y se añadió agua miliQ hasta la marca. A continuación, para cada tipo de microesferas se añadieron con una pipeta Pasteur unas 20-30 microesferas y se cronometró el tiempo de sedimentación de cada una. Con esos tiempos, con la herramienta Excel, se obtuvo la velocidad promedio de sedimentación de cada tipo de microesferas magnéticas.

### 3.6. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN AGUA EN EQUILIBRIO DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS (EWC)

Se cogieron tres réplicas de microesferas magnéticas (5% ferrita p/p alginato) de tres lotes distintos y se estudió su contenido de agua. Para ello, se emplearon 9 tubos Eppendorfs, a los que se hizo agujeros, se midió el peso de cada muestra inicial a temperatura ambiente, y esto

constituyó la medida  $m_0$ . Se aplicó vacío continuo durante 24h a 70°C en el desecador (Vacuo-Temp, Selecta) para evaporar el máximo contenido de agua y se midió de nuevo el peso, constituyendo el valor  $m_1$ . Las muestras se dejaron haciendo vacío otras 24h en el desecador, y tras ello se midió su peso. Se dejaron en el desecador 4h más (sumando un total de 52h de evaporación desde el inicio) para comprobar que el peso ya se había estabilizado. Estas mediciones constituyeron respectivamente los valores de  $m_2$  y  $m_3$ . El contenido en agua en el equilibrio (EWC) de las microesferas se calculó atendiendo a la siguiente fórmula:

$$EWC (wt.%) = \frac{m_{H2O}}{m_3} * 100 = \frac{m_0 - m_3}{m_3} * 100 \quad (Eq. 1)$$

### 3.7. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS POR LAYER-BY-LAYER (LbL)

Para este trabajo se han empleado los pares PLL-CS y PLL-SF para funcionalizar las M.ALG.MAGN por la técnica de LbL. Por un lado, el recubrimiento de PLL-CS se emplea para estabilizar las microesferas e injertarles de dos formas la SF. Por el otro, se realiza una funcionalización que ya integraría la SF por esta técnica, que da resultado al LbL de PLL-SF. Pese a que los polielectrolitos son diferentes, el método de trabajo y los materiales de laboratorio son los mismos. Este requiere de vasos de precipitados de 50 mL, tamices celulares de nylon de 70-40  $\mu$ m, pinceles de silicona, pipetas Pasteur, filtros de jeringa, jeringuillas y un agitador orbital PSU-2T de Biosan.

Teniendo en consideración que las microesferas se almacenaban en ETOH 70%, hay un primer paso en el que ha de ser reemplazado por agua para evitar el apelmazamiento de las microesferas. En este primer paso, las microesferas se extraen del ETOH empleando una pipeta Pasteur y un tamiz. Del tamiz se pasan a un vaso de precipitados con la ayuda de un pincel. Este vaso contiene agua de lavados (preparada y filtrada previamente) en el que las microesferas son agitadas gracias al agitador orbital PSU-2T durante al menos 30 minutos. El movimiento y el exceso de agua permite el intercambio del ETOH por agua y se consigue así que las microesferas vuelvan a su diámetro original. Tras ello, se procede a generar las capas del recubrimiento.

#### 3.7.1. Condiciones generales del proceso de LbL

Los polielectrolitos y el agua se filtraban con filtros PES y jeringuillas antes de comenzar el proceso. Con ayuda de la pipeta Pasteur, tamiz y pincel de silicona, las microesferas se sumergían en un vaso de precipitados que contenía la disolución de polianión y se dejaban en agitación orbital durante 10 minutos. Debido a la carga negativa superficial del alginato de la microesfera, era necesario que la deposición de las capas comenzase por el polianión.

Después, se realizaba un ciclo de lavado de 10 minutos para eliminar los restos del polianión que no habían interactuado. Tras los 10 minutos, las microesferas se sumergían en la disolución del polianión durante 10 minutos, que por su carga negativa, interactuaba electrostáticamente con la capa anterior. De igual forma que con el polianión, se realizaba un lavado de 10 minutos. Llegados a este punto se había constituido la primera bicapa. Se puede repetir el proceso cuantas veces se desee en función de las capas que se busquen, ya que el método de obtención del recubrimiento es cíclico.

#### 3.7.2. Layer-By-Layer PLL-CS (M.ALG.MAGN.PREC)

El protocolo seguido para este par está basado en el de Carvalho *et al.*, 2022 y la mecánica es la explicada en el punto 3.7.1. En esta funcionalización, se depositan 3 capas de PLL como polianión y 2 de CS como poliacación, dejando una superficie rica en PLL con aminas reactivas para posteriormente injertar la SF.

La solución de PLL se preparó al 0,05% p/v en agua miliQ y  $\text{CaCl}_2$  0,075M. Para ello, se descongeló y se pesó la cantidad necesaria sobre un frasco Pyrex® en la balanza de precisión Mettler Toledo, modelo XS104, se añadió el  $\text{CaCl}_2$  y después el volumen de agua requerido para tener la concentración deseada. Se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente durante 1h aproximadamente, y a continuación se ajustó el pH de la disolución a 7 empleando HCl y NaOH de baja molaridad con el pHmetro de sobremesa (pHemomenal® pH 1100L, VWR).

La solución de CS se preparó al 0,1% p/v en agua miliQ y  $\text{CaCl}_2$  0,075M, usándose la misma balanza que para la PLL para pesar la cantidad necesaria. Se añadió el agua miliQ requerida y se mantuvo también una hora en agitación hasta su ajuste de pH a 7.

La solución de lavado consistía en agua miliQ  $\text{CaCl}_2$  0,075M, que se obtenía pesando la cantidad de la sal y añadiendo el volumen de agua requerido para obtener la concentración deseada. Se dejó 10 minutos en agitación magnética y se le ajustó el pH a 7.

### **3.7.3. Layer-By-Layer PLL-SF (M.ALG.MAGN.PLL-SF)**

Para este LbL se ha adaptado el protocolo descrito por Drachuk *et al.*, 2015 y se ha empleado la metodología descrita en el punto 3.7.1. En este recubrimiento, se opta por introducir la SF como polianión aprovechando que a un pH ligeramente básico la PLL (policación) mantiene su carga positiva (Yaroslavov *et al.*, 2003). Por lo tanto, es una alternativa al injerto de SF para presentar este biopolímero en la superficie de las micropartículas. Guiados por la experiencia previa, se opta por recubrir con 3 bicapas PLL-SF las micropartículas, puesto que en otros recubrimientos este número de capas es suficiente para detectar una cantidad destacable de los biopolímeros.

La solución de PLL se preparó al 0,05% p/v en agua miliQ y  $\text{CaCl}_2$  0,075M, es decir, de la misma manera que la explicada en el apartado anterior. Sin embargo, en este caso, el pH de la PLL se ajusta a 7.6. De igual forma, el agua de lavados se obtiene disolviendo en agua miliQ la masa de  $\text{CaCl}_2$  necesaria para obtener una concentración de 0,075M. Luego, se deja 10 minutos en agitación magnética y se ajusta el pH a 7.6.

La solución de SF se preparó de igual manera que la descrita para la preparación de microesferas de fibroína, en el apartado 3.3. No fue necesario ajustar el pH en esta solución puesto que el buffer Tris ya lo ajustaba a 7.6.

A continuación, se filtraron las disoluciones y se procedió de la misma manera que en el protocolo del apartado 3.7.1. Para conferirle mayor estabilidad al recubrimiento, y teniendo en cuenta que no se va a injertar ningún biopolímero sobre el LbL, se entrecruzaron las 3 bicapas depositadas empleando la reacción EDC/NHS modificando el protocolo de Grabska-Zielińska *et al.*, 2021. Para dar lugar a la reacción, se preparó la denominada “disolución entrecruzadora” que contenía una proporción 2/1 de EDC/NHS, a una concentración final de 60mM y 30mM, respectivamente. Al finalizar el protocolo de LbL, las microesferas se entrecruzaron dejándose *overnight* en esta “disolución entrecruzadora” con una agitación suave para evitar que se agregaran. Al día siguiente se hicieron dos lavados con agua miliQ de 10 minutos cada uno.

### **3.8. FUNCIONALIZACIÓN DE MICROESFERAS CON INJERTOS DE SF**

A las microesferas magnéticas funcionalizadas con la precapa constituida por las tres capas de PLL y dos de CS se les realizó un injerto directo de SF empleando dos agentes de entrecruzamiento: el glutaraldehído y el EDC/NHS. Esta deposición se realizó sobre la última capa de PLL, que contiene grupos amina con los que interactuar covalentemente.

### **3.8.1. Injerto por glutaraldehído (M.ALG.MAGN.PREC-SF-(GA))**

Para esta deposición se adaptó el protocolo descrito por Qiao *et al.*, 2017. Se aprovechó la capacidad reactiva del GA con los grupos amino de la PLL y la SF. Se trabajó en vitrina de extracción de gases debido a la toxicidad de este agente. Para el manejo de las microesferas se emplearon tamices celulares, pipetas Pasteur y pinceles de silicona, así como el agitador orbital PSU-2T de Biosan para mantener las microesferas en agitación en todo momento. Todos los baños y lavados realizados a las microesferas se hicieron empleando vasos de precipitados.

Las microesferas se sumergieron en la disolución de SF (1mg/mL), previamente preparada según lo descrito en el punto 3.3 y se mantuvieron en ella durante 2h. Se trató de no exceder este tiempo por la metaestabilidad de la SF (Nogueira *et al.*, 2011). Tras ello, se hicieron dos lavados con agua miliQ de 10 minutos cada uno. Después, se sumergieron las microesferas con SF adsorbida en la superficie en una solución 2% p/v de GA en agua miliQ. Se mantuvieron durante 1h en esta disolución bajo una agitación suave para evitar los agregados y seguido de ello se realizaron dos lavados con agua miliQ de 15 minutos cada uno. Por último, se preparó una disolución acuosa de glicina (Gly) 0,1M con el fin de inactivar los grupos aldehído no reaccionados del GA. Se dejaron las microesferas en esta disolución *overnight* en el agitador orbital, y al día siguiente se realizaron dos lavados con agua miliQ de 10 minutos cada uno.

### **3.8.2. Injerto por EDC/NHS (M.ALG.MAGN.PREC.SF(EDC/NHS))**

Sacando provecho de los grupos amina de la PLL y de los carboxilo de la SF, se probó a realizar el injerto por la reacción de EDC/NHS. Este tipo de injerto se realizó con la esperanza de poder sustituir al glutaraldehído, eliminando así posibles factores tóxicos de las microesferas que luego se emplearían en cultivo. Para el manejo de las microesferas se emplearon tamices celulares, pipetas Pasteur y pinceles de silicona, así como el agitador orbital PSU-2T de Biosan para mantener las microesferas en agitación en todo momento. Todos los baños y lavados realizados a las microesferas se hicieron empleando vasos de precipitados.

La solución de EDC/NHS con la que se realizó el injerto se preparó de la misma manera que la “disolución entrecruzadora” explicada en el apartado 3.7.3. Como en el caso del injerto por GA, las microesferas se sumergieron en la disolución de SF (1mg/mL) preparada a partir del procedimiento explicado en el punto 3.3. Las microesferas estuvieron en esta disolución durante 2h. Tras ello, se hicieron dos lavados con agua miliQ de 10 minutos cada uno. Después, se recogieron las microesferas y se dejaron *overnight* en la disolución de EDC/NHS en el agitador orbital para promover el entrecruzamiento. Al día siguiente se hicieron dos lavados con agua miliQ de 10 minutos cada uno.

## **3.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS**

Para el estudio de la forma de las microesferas, su distribución de tamaños o su estabilidad, se ha empleado el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100-F, que cuenta con una cámara fotográfica integrada. Para ello, las microesferas se dispusieron en diferentes superficies y en todos los casos embebidas en algún líquido (generalmente agua) para captar su diámetro real. Las imágenes obtenidas se analizaron haciendo uso del software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### **3.9.1. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo criogénico (CRYO-FESEM)**

Las microesferas fueron analizadas interna y topográficamente mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo Criogénico (CRYO-FESEM). En este trabajo se analizaron las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) y las M.ALG.MAGN como control.

Para ello, se acudió al Servicio de Microscopía de la UPV, donde cuentan con un equipo de FESEM (ZEISS Ultra-55). Las muestras se cargaron en un portaobjetos y se criofijaron rápidamente en un baño de nitrógeno al punto de nieve (-196°C). Las muestras se congelaron, se vitrificó el hielo y se sometieron a vacío. Para poder ver el interior y la superficie de las microesferas, las muestras se fracturaron mediante un golpe seco con una cuchilla fría. A continuación, se sublimó el agua a alto vacío durante 15 minutos, y la temperatura se estabilizó en -90°C. Se pasaron las muestras (sin aplicar ningún tipo de recubrimiento) al microscopio electrónico y se tomaron imágenes a diferentes aumentos con un haz de electrones de 1kV.

### **3.9.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)**

El análisis FTIR se utiliza para la identificación de materiales inorgánicos y orgánicos empleando la radiación en el espectro infrarrojo. Una parte de esta radiación la absorbe el material y la otra la transmite hacia el receptor del espectrofotómetro. Esta robusta técnica se utiliza para identificar grupos funcionales característicos a partir de las bandas espectrales, por lo que resulta en un análisis cualitativo de las muestras. La espectroscopía infrarroja suele medir longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendidas entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro, entonces, consta de picos de absorción específicos a las frecuencias de absorción entre los enlaces de los átomos de la muestra, y esto es lo que permite identificar sus componentes (Beć *et al.*, 2020).

En este trabajo se examinaron los espectros de todas las microesferas fabricadas, además de cada componente en estado puro. Para ello se hizo uso del equipo espectrómetro ALPHA FT-IR (Bruker), que capta la energía transmitida por la muestra y con ella genera los espectros. El espectro se analizó desde una longitud de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , con 24 escáneres. Los resultados se representaron empleando Excel.

### **3.9.3. Análisis termogravimétrico (TGA)**

El estudio de la degradación térmica de los materiales permite, con el correcto análisis de los datos, la identificación de sus componentes y la fracción en que están presentes en la muestra. El fundamento del TGA radica en la variación del peso de las muestras como consecuencia de la degradación térmica del material al aumentar la temperatura a velocidad constante. Se produce una pérdida de masa cuando se alcanzan valores de energía térmica que superan la energía que mantiene los enlaces químicos inter e intramoleculares de la muestra y se desprenden sustancias volátiles. Cada muestra se introduce en una cápsula y se mide el peso con gran sensibilidad mediante una microbalanza de precisión. De esta manera, el descenso del peso con el calentamiento de la muestra queda monitorizado (De Blasio, 2019).

Con intención de cuantificar la cantidad de fibroína en cada uno de los microgeles fabricados, se empleó un analizador termogravimétrico modelo Thermal Analysis System TGA/DSC 2, de la casa Mettler Toledo. El programa empleado en el equipo para realizar el análisis termogravimétrico contaba con una velocidad de calentamiento de 10°C/minuto desde 25°C hasta 1000°C y un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. Las muestras tenían un peso inicial de unos 5-10 mg. Esta técnica se emplea en el presente trabajo para demostrar que existe una parte de las microesferas funcionalizadas que constan en efecto con esa funcionalización. Para ello, se



han comparado las derivadas del peso (normalizado al peso en seco por el alto contenido en agua) con respecto a la temperatura de las microesferas funcionalizadas con las M.ALG.MAGN. sin funcionalizar. Todo el trabajo con los espectros termogravimétricos, sus derivadas y análisis se ha realizado en Excel.

### 3.10. ENSAYO DE ESTABILIDAD

Con la finalidad de observar a nivel cualitativo la integridad de las microesferas en distintos medios se ha realizado una prueba de estabilidad. Es imprescindible que las microesferas a emplear en el cultivo celular mantengan su integridad en el medio de cultivo, cosa que se pone en riesgo por el tipo de enlace del alginato de nuestros microgeles (iónico y reversible). Por esta razón, se han hecho pruebas en el medio de cultivo RPMI 1640 (el empleado posteriormente para el cultivo de MMC) de todas las microesferas que se pensaba emplear en cultivos celulares: M.ALG-SF(GA), M.ALG-SF(EDC/NHS) M.ALG.MAGN.PREC y M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA).

Por otro lado, para eliminar el alginato del interior de las microesferas, se emplea Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA es un quelante del calcio, que por su mayor afinidad por este, revierte el enlace iónico del alginato. En este ensayo se ha probado si las microesferas previamente comentadas podrían soportar la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$ , con intención de comprender mejor su estabilidad química, obtener cápsulas huecas u obtener microesferas solo de SF.

Para el ensayo por tanto, se colocaron 100 $\mu\text{L}$  de EDTA, de RPMI 1640 y se empleó agua como control. En ellos se sumergieron 10 $\mu\text{L}$  de microesferas de todos los tipos comentados húmedas. Se observaron con el microscopio óptico invertido a día 0, día 2 y día 5 (duración máxima de los cultivos de MM habituales) y se tomaron fotografías para realizar la evaluación cualitativa.

### 3.11. CULTIVO CELULAR

El objetivo principal a conseguir con el microgel es la puesta a punto de una plataforma para el cultivo de MMC. Estas células se cultivan en suspensión, por lo tanto, un parámetro esencial es la ligera agitación que han de mantener las células y el microgel en el medio líquido.

El soporte para el cultivo de las RPMI 8226 se ha basado en criotubos de 2mL, cuya rosca está agujereada para permitir el intercambio gaseoso. Los criotubos se colocan en un agitador rotacional Multi Bio RS-24 de Biosan que le provee una agitación suficiente para mantener el cultivo en suspensión, pero suave para no generar daños en las MMC. Se emplearon los parámetros 25 rpm,  $\pm 50^\circ$  de oscilación, en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  y 37°C. En esta plataforma, el cultivo celular se realiza en un volumen total de 200 $\mu\text{L}$ , donde se encuentran la suspensión de RPMI 8226, el medio de cultivo y las microesferas si proceden.

Para comprobar que las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) no son citotóxicas para las MMC, se diseñó un cultivo celular con 3 condiciones diferentes: suspensión de células RPMI 8226, suspensión de células RPMI 8226 + M.ALG.MAGN.PREC, suspensión de células RPMI 8226 + M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA).

En los criotubos con microesferas su concentración era del 7%, es decir, en ellos había 14 $\mu\text{L}$  de microesferas. En todos los criotubos se preparó una concentración de células equivalente a 60.000 células por cada 100 $\mu\text{L}$ . El esquema con los parámetros iniciales para cada condición se representa en la Figura 9.



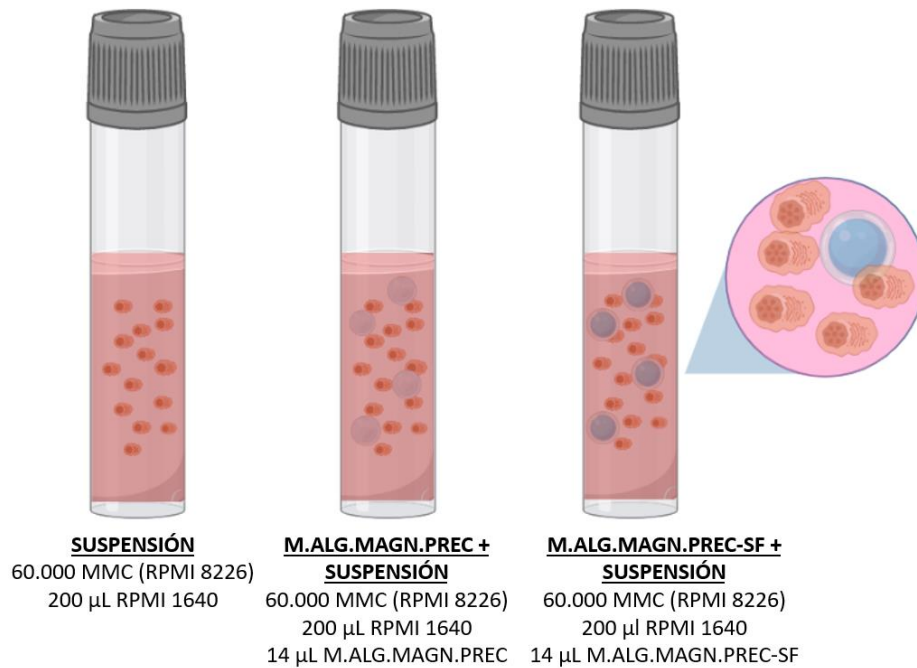


Figura 9. Esquema del diseño de las series del cultivo celular y sus componentes. Realizado con BioRender.

### 3.11.1. Descongelación y expansión celular

En el cultivo celular se utilizó la línea celular RPMI 8226 de MM. Las células se conservan en criotubos en un tanque Dewar de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . El medio de congelación de estas células está basado en 95% v/v de medio completo MM (RPMI 1640, suplementado con 10% FBS, 1% L-Glutamina, 1% P/S) y 5% v/v de DMSO.

El descongelado celular es un proceso que ha de realizarse muy rápido para evitar que el DMSO entre en las células y las dañe. Y esto es así ya que el DMSO es un crioprotector permeable que se añade para evitar la formación de cristales de hielo durante la congelación, pero resulta tóxico para las células a temperatura ambiente. Por lo tanto, inicialmente se prepara un volumen suficiente de medio de cultivo completo para la expansión celular, compuesto por un 88% de medio de cultivo RPMI 1640, un 10% de FBS, un 1% P/S y 1% L-Glutamina. Este medio completo MM se filtra con un filtro PES de jeringuilla de  $0.22\ \mu\text{m}$  y se atempera en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  (Termostatic Bath BAE 04, Raypar).

Para la descongelación, el criotubo se dejó atemperar en el baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y se pasó el contenido a un Falcon con medio completo MM, para diluir el crioprotector. Se centrifugó durante 5 minutos a 250 G, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo nuevo. Las células de la línea celular con la que se trabaja son no-adherentes, por lo que se cultivan en suspensión. Por esta razón, la expansión se realizó en un Flascón T25 no tratado (al que se añadieron 5mL de medio completo MM por millón de células) y se dejó en posición vertical en el incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  durante 72 horas.

### 3.11.2. Desinfección de materiales

Antes de empezar el cultivo es necesario tener los materiales M.ALG.MAGN.PREC y M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) desinfectados. Para ello, se realizaron diversos lavados siguiendo el siguiente orden:

ETOH 70% > ETOH 70% > ETOH 70% > ETOH 70% > agua > agua > agua > Medio sin FBS >  
Medio sin FBS > Medio sin FBS

Cada ciclo de lavado duró 10 minutos, de los cuales los 7 primeros fueron en agitación rotacional en el Multi Rotator y los últimos 3 en reposo, para promover la sedimentación y perder la menor cantidad de microesferas en los tamices. Para el manejo de las microesferas, se empleó un tubo Falcon de 15 mL estéril que se llenó con 10 mL de cada líquido por paso de la desinfección. Además, se empleó un tamiz por tipo de líquido y un pincel para mover las microesferas. El último lavado en medio de cultivo sin FBS se dejó a 4°C *overnight* en la nevera.

### **3.11.3. Siembra y mantenimiento del microgel**

Para sembrar el cultivo, se ha de tener en cuenta la cantidad de muestras o criotubos a sembrar. Teniendo en cuenta que se requieren 4 réplicas biológicas por cada tiempo de ensayo de MTS y por condición (descritas en la Figura 9), se necesitan 8 criotubos por condición para este ensayo. Además, antes de sembrar es necesario preparar el medio completo MM necesario para todo el cultivo y obtener las células y las microesferas a las concentraciones deseadas (comentadas previamente).

Para obtener las células y microesferas a la concentración deseada, se prepara una solución de RPMI 8226 en medio completo MM a 60000 RPMI 8226/100 uL y soluciones de medio completo MM con microesferas de ambos tipos a 14 uL de microesferas/100 uL. Para las células, se parte del Flascón en expansión, se calculó la concentración inicial mediante recuento en una cámara Neubauer y se diluyó la suspensión celular (SUSP) hasta alcanzar la concentración deseada. Para las microesferas, por otro lado, se cambió el medio sin FBS en el que estaban suspendidas por medio completo MM. Finalmente, se añaden los 100µL de suspensión celular en cada criotubo y en función de cada condición se añadieron 100µL de medio de cultivo o 100µL de medio con microgel.

Una vez listos todos los criotubos del cultivo, se colocaron en la plataforma del biorreactor, que estaba ya con los parámetros programados dentro del incubador. Mientras, las células restantes se mantuvieron en otro Flascón en expansión para obtener las curvas de células en los ensayos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS). Luego, cada día, se realizaba a los criotubos un cambio de medio debido a la evaporación de este y el poco volumen en cultivo. Este cambio de medio consistía en añadir 200 µL de medio completo MM y, tras 1 hora sin estimulación mecánica (reposo), retirar el volumen añadido. Este medio no podía contener rojo fenol de cara al ensayo MTS, ya que podría interferir con el reactivo en caso de estar presente. Con ese tiempo de 1h entre la incorporación y la retirada de medio, tanto las células como las microesferas se posan si no se les provee de agitación, permitiendo eliminar el sobrenadante sin modificar el contenido del criotubo.

### **3.11.4. Ensayo de proliferación y viabilidad celular**

Para evaluar la viabilidad y proliferación celular en la plataforma de cultivo sintetizada se realizó un ensayo MTS, que permite caracterizar la viabilidad celular de las MMC. Este ensayo colorimétrico se fundamenta en el uso del MTS, agente que se reduce por la actividad metabólica mitocondrial de las células y genera un compuesto que produce un cambio de coloración en el medio cuyo máximo de absorbancia se encuentra en 490nm (Riss *et al.*, 2013). Esto se traduce en que si las células están activas metabólicamente hablando, habrá un cambio en la coloración del reactivo (hacia tonos marrones). Si por contra, estuvieran muriendo a causa de nuestros materiales o condiciones, el reactivo mantendría su color inicial.

Este ensayo se realizó tras 1 y 3 días en cultivo, tiempo suficiente para comprobar si las células de MM se han adaptado a la plataforma con los materiales añadidos. Para cada día de ensayo, se emplearon 4 réplicas biológicas de cada condición que luego no se pudieron reincorporar al cultivo. Además de las muestras, se preparó una curva de calibrado celular con una suspensión celular a distintas concentraciones conocidas: 600.000, 300.000, 150.000 y 75.000 y 0 (blanco) células por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra. También se comprobó en el MTS a día 1 si el microgel sin células retenía reactivo MTS.

Para preparar las muestras, se cambió el contenido del criotubo a un tubo Eppendorf (para poderlas centrifugar). Tras el cambio, se centrifugaron las muestras a 250G durante 5 minutos y se sustituyó el sobrenadante por 220  $\mu\text{L}$  de medio completo MM. Cuando todas las muestras tuvieron el volumen de medio necesario, se añadieron 22  $\mu\text{L}$  de reactivo MTS (relación 1:11) en oscuridad debido a la fotosensibilidad del reactivo. También se añadieron 22  $\mu\text{L}$  de MTS a los 220  $\mu\text{L}$  de muestras para generar la curva celular patrón y a las de las microesferas.

Se dejaron las muestras y patrones en el incubador reaccionando durante 1h. Tras la reacción, todas ellas se centrifugaron durante 5 minutos a 250G. Luego, se prepararon 2 réplicas técnicas, de 100  $\mu\text{L}$  cada una, a partir del sobrenadante de cada réplica biológica sobre una placa multipocillo p96. Por último, se leyó la absorbancia de la placa a 490nm con el espectrofotómetro (Microplate reader Victor 3, Perkins-Elmer). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente y se representaron gráficamente con GraphPad Prism version 8.0.2. (GraphPad Software, USA) y Excel.

### 3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la distribución de tamaños y los datos de caracterización de las microesferas magnéticas se proporcionan como la media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con Excel y GraphPad Prism 8.0.2. Se analizaron los datos para retirar los valores atípicos utilizando el método ROUT con una Q del 5%. Para analizar la normalidad de los datos procedentes del ensayo de determinación de la concentración de nanopartículas magnéticas en las microesferas de alginato se aplicó un one-way ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) con la corrección de Tukey's para múltiples comparaciones. Para el ensayo de viabilidad y proliferación celular se realizaron 4 réplicas biológicas por tipo de muestra y se realizó un test Shapiro-Wilk para analizar la distribución normal de los datos. Se realizó un two-way ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) aplicando la corrección de Tukey's para múltiples comparaciones. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas cuyo *p-value* fuese  $\leq 0,05$ . Las diferencias entre grupos se expresan como  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*),  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*) en muestras normales y  $p \geq 0,05$  (ns) en muestras no normales. En el Anexo se pueden ver los resultados del análisis estadístico.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado global de este trabajo es la generación de un microgel que contenga SF, sirva como entorno tridimensional y reproduzca el nicho biológico de las MMC para ser utilizado como modelo de enfermedad. Se pretende que la respuesta celular con los microgeles funcionalizados se asemeje a la que se produciría *in vivo*.

Se van a estudiar y caracterizar mediante distintas técnicas los distintos tipos de microesferas sintetizadas por microfluídica. Se discutirá qué tipo de microesferas con SF son las más adecuadas para el cultivo celular planteando un ensayo de estabilidad. Con ello, se diseñará una plataforma de cultivo con MMC en suspensión con el microgel y se analizará la viabilidad y proliferación celular mediante un ensayo MTS.

### 4.1. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS (M.ALG.MAGN)

En primer lugar, se fabricaron microesferas con las bombas y el sistema de microfluídica variando los flujos de medio continuo y discontinuo (según lo descrito en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos). Estos van desde 20 mL/h a 120 mL/h en el medio continuo y de 1 a 2 mL/h en el discontinuo. Para definir unos parámetros como óptimos se atendió al rendimiento de microesferas, al volumen de medio continuo y colector a utilizar, a las capacidades del sistema de microfluídica, además de a la dispersión de tamaños y estabilidad en la forma de las microesferas. Para realizar la valoración, se observaron las microesferas con cada par de flujos en el microscopio óptico y se midieron los tamaños con el software de análisis de imagen ImageJ.

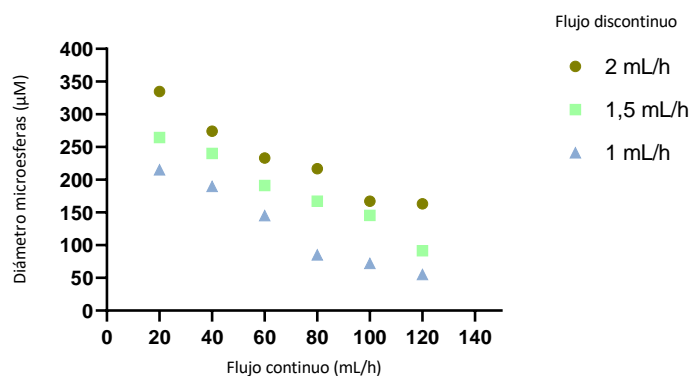


Figura 10. Distribución de tamaños de las microesferas de alginato magnéticas.

Como puede verse en la Figura 10, la variación tanto del flujo continuo como del discontinuo tienen efecto sobre el diámetro medio obtenido. No obstante, se observa que la influencia del medio discontinuo en el tamaño es menor a la del medio continuo. En la gráfica se aprecia que el aumento del flujo continuo provoca la disminución del tamaño de las microesferas. Esto se atribuye al efecto de cizallamiento que ejerce la fase continua sobre la discontinua en los sistemas de tipo *flow-focusing*, ya que a mayor flujo, mayor fuerza de cizalla y la rotura de las microgotas sucede con mayor facilidad (Li *et al.*, 2018). Asimismo, la Figura 10 muestra que si se aumenta el valor del flujo discontinuo, el tamaño de las microesferas que se forman es mayor. Esto se explicaría con la mayor resistencia que ofrecería el flujo discontinuo sobre el continuo para la formación de las gotas (Gañán-Calvo & Gordillo, 2001).

Viendo las desviaciones típicas de todos los pares (Tabla 2 del apartado 7.1 del Anexo), se llega a la conclusión de que utilizar valores de flujo continuo extremos perjudica al sistema de

microfluídica al ponerlo al límite de su capacidad. También se observa en los resultados de la Tabla 2, que, para obtener microesferas de unos 200  $\mu\text{m}$ , el flujo discontinuo de 2 mL/h requiere de mucho medio continuo y da elevadas dispersiones. Esto hace que en este trabajo se escoja el flujo discontinuo intermedio para la obtención de microesferas, ya que tiene menor dispersión de tamaños que el de 2 mL/h, y además se obtiene un mayor rendimiento que con el de 1 mL/h.

No obstante, se decidió intentar mejorar aún más la dispersión de las microesferas obtenidas, acotando el rango estable de los valores de flujo entre 60 y 70 mL/h para la fase continua y entre 1,45 y 1,60 mL/h para la discontinua. Al estudiar la desviación estándar en este rango de parámetros (Tabla 1) no se observaron demasiadas diferencias, pero los valores de 65 mL/h para el medio continuo y 1,55 mL/h para el discontinuo fueron los que menos dispersión presentaron y los que se usaron el resto del proyecto.

Tabla 1. Diámetro de las microesferas de alginato magnéticas en un rango acotado.

FLUJO DISCONTINUO (mL/h)	FLUJO CONTINUO (mL/h)	DIÁMETRO PROMEDIO ( $\mu\text{m}$ )	DESVIACIÓN ESTÁNDAR ( $\mu\text{m}$ )
1,45	60	185,32	17,84
	65	176,15	19,52
	70	167,16	22,76
1,50	60	191,06	17,85
	65	181,65	16,85
	70	174,66	17,26
1,55	60	195,34	16,14
	65	187,25	15,72
	70	178,46	17,33
1,60	60	198,38	28,49
	65	189,18	23,28
	70	185,14	21,99

Una vez se encontraron los valores de flujo óptimos que permitían la obtención de M.ALG.MAGN de manera reproducible, se construyó un histograma con las frecuencias de tamaño de las microesferas. En la Figura 11 se puede observar que los diámetros promedios de las microesferas sintetizadas se encontraban mayoritariamente en el rango 170-200  $\mu\text{m}$ .

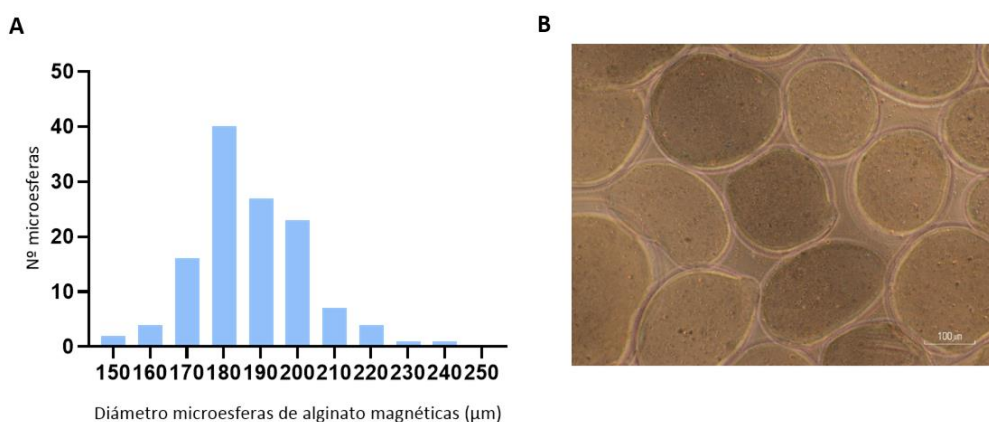


Figura 11. Microesferas de alginato magnéticas sintetizadas a unos valores de flujo de medio continuo de 65 mL/h y 1,55 mL/h de discontinuo: A) Histograma de la distribución de tamaños; B) Observadas en el microscopio óptico invertido (barra de escala 100  $\mu\text{m}$ ).

## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS

Con los flujos para la fabricación de microesferas optimizados para el porcentaje de 5% p/p de ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), se fabricaron 3 tipos de M.ALG.MAGN a diferentes concentraciones. Se ensayaron las concentraciones de 2,5; 5 y 10%  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  p/p alginato.

Lo que se buscaba con el porcentaje de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  era conseguir que las microesferas pudieran manipularse con un imán (para poder manejarlas durante la síntesis de microesferas) pero que a su vez, no pesaran tanto como para que el biorreactor no pudiera mantener la suspensión del microgel. Por tanto, se probaron estos tres porcentajes porque permiten el fácil movimiento de las microesferas empleando imanes y porque están dentro del rango que se ha considerado como viable para mantener la suspensión. Como el aspecto clave es el mantenimiento de la suspensión, se idea el ensayo de la velocidad de sedimentación de las M.ALG.MAGN.

Como era de esperar, la velocidad de sedimentación de las M.ALG.MAGN con 10% p/p ALG fue la más elevada ( $3,808 \pm 1,871$  cm/min) y las M.ALG.MAGN 2,5% p/p ALG fueron las más lentas en caer ( $1,635 \pm 0,519$  cm/min). De cara al cultivo celular, no se deseaba que las M.ALG.MAGN sedimentasen muy rápidamente porque podrían tener un efecto negativo sobre la biomimetización de la plataforma. Estos resultados hacen que se descarten las del 10%, no solo por la velocidad, sino por la elevada dispersión de velocidades comparada con las otras dos. Luego, como se deseaba que hubiese cierto grado de magnetización en las M.ALG.MAGN de cara a trabajar cómodamente con el microgel en técnicas futuras como la citometría de flujo, se descartaron las del 2,5%. Tras valorar las diferencias en la velocidad de sedimentación entre las del 2,5% y las del 5% ( $2,231 \pm 0,713$ ), se consideran diferencias pequeñas y no significativas estadísticamente (Tabla 3 del apartado 7.2 del Anexo) en la velocidad de sedimentación. Esto confirma nuestra hipótesis de que las M.ALG.MAGN al 5% p/p ALG mantienen cómodamente la suspensión en la plataforma y añaden el carácter magnético a las microesferas que ya se habían empleado con anterioridad en el biorreactor.

Con el ensayo EWC se pudo determinar la cantidad de agua que absorben las microesferas. Aplicando la *Eq.1* se determinó que por gramo de microesfera hay  $43,8 \pm 7,4$  g de agua, y que había  $22,76$   $\mu\text{g}$  de material/  $\mu\text{L}$  de microesferas. Este resultado concuerda con el bajo porcentaje de masa que se tiene de base en las microesferas, ya que su material principal (el alginato) se encuentra al 1.5% p/v.

## 4.3. CRYO-FESEM

Con las imágenes de CRYO-FESEM se estudió topográficamente la superficie y el interior de las M.ALG.MAGN, y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA). Como consecuencia de la congelación de la muestra, crecieron cristales de agua que desplazaron internamente a las cadenas reticuladas de alginato. En la Figura 12 se observa una gran cantidad de poros de pequeño tamaño, además de algunas nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (que son de mayor tamaño que los poros). Puede apreciarse que la microesfera en sí es muy compacta, lo que indica que la concentración de alginato empleada en la síntesis (1.5% p/v) a pesar de parecer baja, es adecuada por la consistencia de las microesferas. Además, ampliando la zona de la superficie de la microesfera, se observa que esta es bastante lisa.



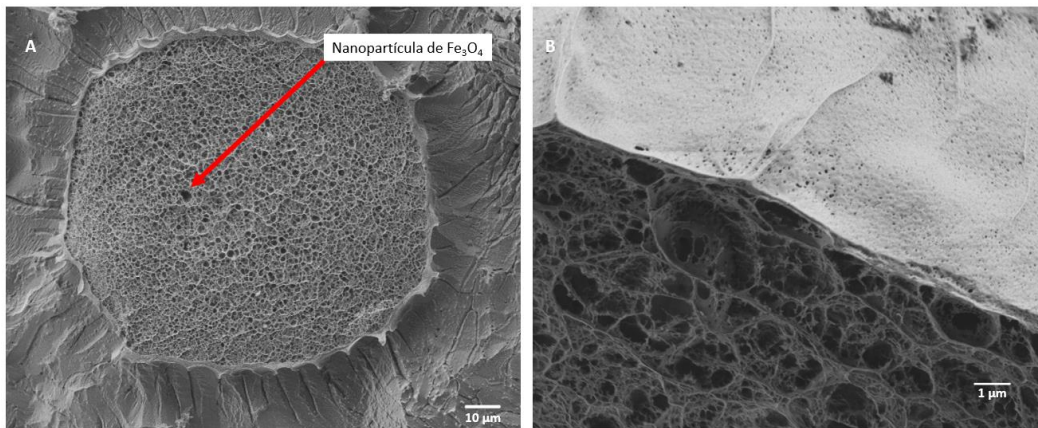


Figura 12. Microesfera de alginato magnética: A) A 600 aumentos; B) Detalle de su superficie a 6000 aumentos.

Al observar la morfología de la muestra de M. ALG.MAGN.PREC-SF (GA) mediante CRYO-FESEM se puede observar un mayor grado de compactación de la microesfera (Figura 13). El interior de la misma parece estar más compacto y no es tan poroso como en el caso de las M.ALG.MAGN (Figura 12), ya que visualmente no se aprecian tantas trabéculas. Se siguen apreciando las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en su interior. Al observar la superficie de la microesfera, puede verse cómo esta ha aumentado su grosor. Este hecho se atribuye al recubrimiento del LbL y el posterior injerto de la SF, lo que nos permite afirmar su presencia visualmente en las microesferas.

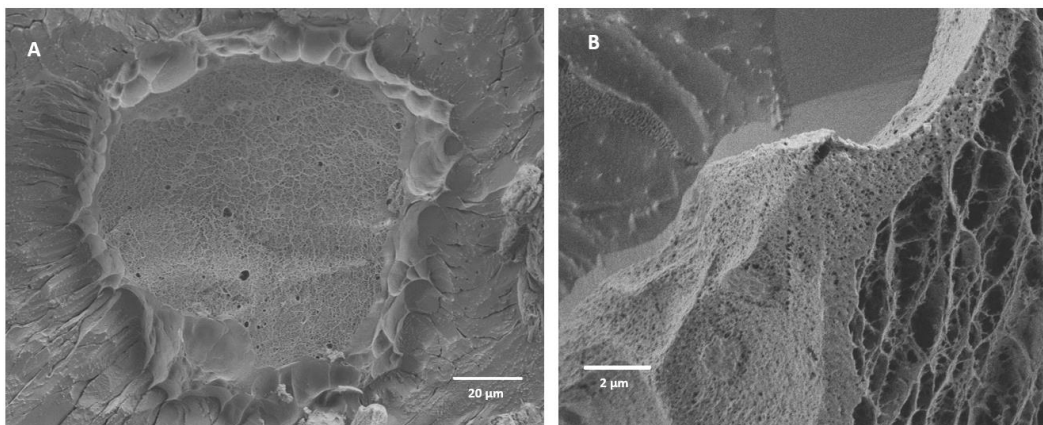


Figura 13. Microesfera de alginato magnética funcionalizada con la precapa e injerto de SF mediante GA: A) A 600 aumentos; B) Detalle de su superficie a 6000 aumentos.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS

Las M.ALG.MAGN.PREC, M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(EDC/NHS) se realizaron según lo dispuesto en el apartado 3.7 y 3.8 de Materiales y Métodos. Para demostrar la presencia del recubrimiento e injerto se realizaron ensayos de FTIR y de TGA.

##### 4.4.1. FTIR

Los datos del espectrofotómetro ALPHA FT-IR se exportaron en formato .txt y se analizaron con la herramienta Excel. Para evitar la superposición de las gráficas se sumó o restó un valor fijo a todos los valores de transmitancia (esta magnitud no presenta unidades), e iría situada en el eje Y. En el eje X se representa la longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

La banda ancha alrededor de  $3300\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 14 indica los estiramientos de grupos hidroxilo (O-H) debido a la presencia de agua en las muestras. Los picos  $1624\text{ cm}^{-1}$  y  $1414\text{ cm}^{-1}$  presentes en los tres espectros se deben al estiramiento de grupos éster ( $\text{COO}^-$ ) de los carbohidratos del alginato (Uyen *et al.*, 2019). Los picos en la región de  $2900\text{ cm}^{-1}$  se deben al estiramiento de hidrocarburos (C-H), y junto con los comprendidos por debajo de  $1121\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la absorción de Fe-O de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Grujić *et al.*, 2018; Kachi *et al.*, 2019), que no están presentes en las microesferas de alginato.

La precapa estaba constituida de PLL y CS, cuya presencia puede apreciarse al comparar el espectro de las M.ALG.MAGN. con las de precapa. A pesar de ser muy similares, se puede ver un ligero alargamiento y estrechamiento de los picos de  $1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1484\text{ cm}^{-1}$  y  $1183\text{ cm}^{-1}$ . Esto se atribuye a la presencia de amidas tipo I,  $\text{COO}^-$  y carbonilos (C=O), respectivamente presentes en ambos biomateriales (Rozenberg & Shoham, 2007; Xi *et al.*, 2012). Por lo tanto, se demuestra la presencia de la precapa en las microesferas con el LbL.

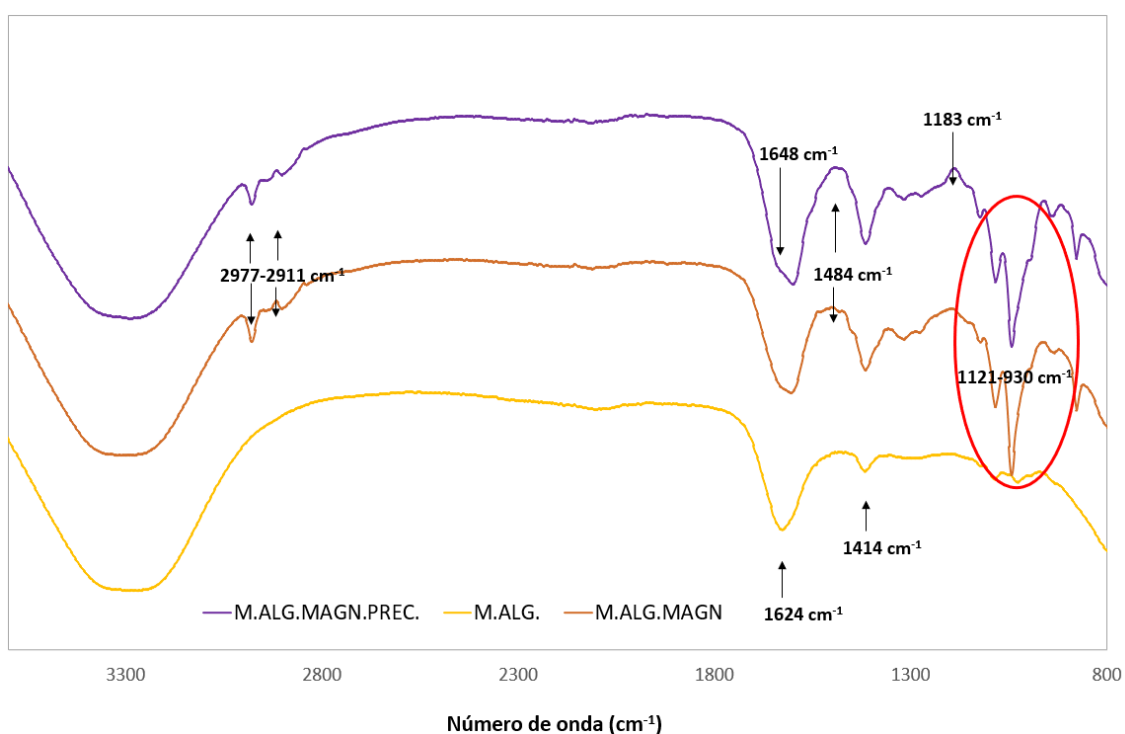


Figura 14. Espectros de FTIR M.ALG., M.ALG.MAGN. y M.ALG.MAGN.PREC. con sus picos característicos.

En la Figura 15 puede verse que los picos de la región de  $2900\text{ cm}^{-1}$  de las M.ALG.MAGN.PREC. se han visto ligeramente desplazados hacia un menor número de onda en las microesferas con el injerto de fibroína.

Debido a la presencia de grupos amida en la SF, se encuentran bandas vibracionales características alrededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$  que se asignan al pico de absorción del esqueleto peptídico de la amida I (estiramiento C = O), y en  $1519\text{ cm}^{-1}$  debidos a la amida II (unión N-H). Las bandas alrededor de  $1500$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la amida III (estiramiento C-N) (Zhang *et al.*, 2012).

Si se comparan las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) con las M.ALG.MAGN.PREC, se puede observar en  $1729\text{ cm}^{-1}$  que puede asociarse al estiramiento por los grupos carbonilo por la tendencia de la SF a formar su primer pico característico. Asimismo, se observa un estrechamiento de esta



primera banda característica en  $1640\text{ cm}^{-1}$  y deja de apreciarse la caída de  $1648\text{ cm}^{-1}$  por la presencia de SF, que alarga y estrecha el pico. En  $1519\text{ cm}^{-1}$ , en las microesferas con SF aparece una banda que indica la tendencia de la SF a formar su segundo pico característico. Además, la región entre  $1500$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  es más estrecha, indicando una ligera tendencia a formar el tercer pico correspondiente al estiramiento C-N de la amida III.

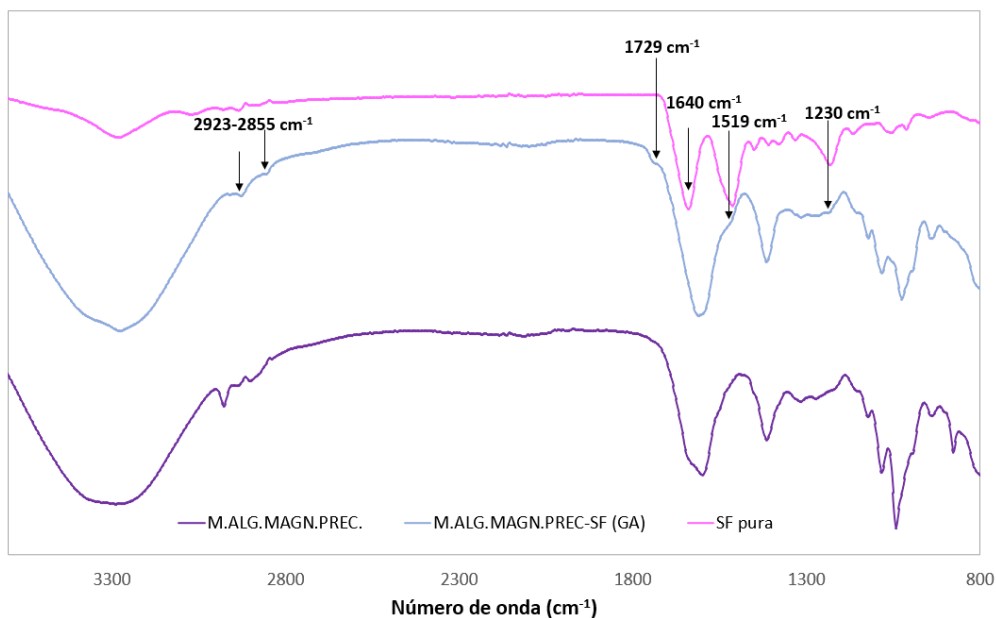


Figura 15. Espectros FTIR de las M.ALG.MAGN.PREC, M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA) y la SF pura con sus picos característicos

Cabe mencionar que durante el proyecto, se probó inicialmente a injertar la SF sobre las M.ALG.MAGN.PREC incubándolas primero en la disolución de GA 2% p/v 1h (M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF) y después se mantuvieron en la disolución de SF 1mg/mL durante 2h. No obstante, este protocolo de deposición no pareció funcionar tan bien, ya que los picos característicos de la SF que se han comentado anteriormente ( $1729\text{ cm}^{-1}$ ,  $1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1519\text{ cm}^{-1}$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$ ) y permitían detectar su presencia, en este caso no se aprecian con tanta claridad (Figura 25 del apartado 7.3 del Anexo).

También se realizó un FTIR de las M.ALG.MAGN.PREC-SF(EDC/NHS) y de las M.ALG.MAGN.PLL-SF (representado en la Figura 25, en el 7.3 del Anexo). En estos casos, en los que se ha utilizado EDC/NHS como *crosslinker*, no puede detectarse la presencia de SF, solamente se aprecian picos característicos debidos a la PLL ( $1484\text{ cm}^{-1}$ ). La caída del pico en  $1519\text{ cm}^{-1}$  también está presente en las M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF, aunque muy ligeramente, pero no en las entrecruzadas con EDC/NHS. Esto indica que este último tratamiento con carbodiimida no es lo suficientemente reactivo como para entrecruzar los grupos amino de la PLL con la SF, hecho que sí puede hacer el GA.

En la Figura 25, destaca sobre todo el pico de  $1729\text{ cm}^{-1}$  que únicamente está presente en las del injerto con GA tras la adsorción de la SF sobre la superficie de las microesferas (*a posteriori*). Por lo tanto, el FTIR nos permite asegurar que las M.ALG.MAGN.PREC han adsorbido SF en su superficie cuando se han tratado con GA *a posteriori*.

#### 4.4.2. TGA

Con el TGA se puede comparar la degradación térmica de las microesferas con las distintas funcionalizaciones. Los datos se exportaron del TGA/DSC 2 en formato .txt y se trabajaron en Excel. Además, se ha podido determinar la fracción de SF con respecto al peso total utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Fracción SF (\% p/p)} = \frac{\text{fracción peso perdido por las microesferas a } 291^{\circ}\text{C}}{\text{fracción peso perdido a } 291^{\circ}\text{C por la SF pura}} * 100 \text{ (Eq.2)}$$

En el apartado 7.4 del Anexo se muestran las gráficas (Figuras 26-30) de la pérdida de peso de las microesferas en húmedo y la evolución del peso en seco con respecto a la temperatura que se van a discutir a continuación. En estas gráficas anteriormente mencionadas puede verse que la gran caída de peso de las muestras se produce en el intervalo 100-200 °C, correspondiendo con la evaporación de agua de las microesferas. Por ello, se ha considerado que a 200°C ya se tiene el peso seco de los materiales que componen las microesferas, y por ello, el peso a 200°C es el que se ha utilizado para obtener los resultados y conclusiones de este ensayo.

En la Figura 16 se ha representado la derivada de la caída del peso normalizada con el peso seco de las M.ALG.MAGN. y las M.ALG.MAGN.PREC frente a la temperatura (°C). Los picos de la derivada se corresponden con las caídas de peso. En las M.ALG.MAGN se observa que el peso se pierde en dos fases, una centrada en 254°C y otra en 354°C. Estos picos de degradación son característicos del alginato (Baybaş *et al.*, 2021) también se observan en las M.ALG.MAGN.PREC, aunque aparecen ligeramente desplazados (242°C y 400°C, respectivamente) por la influencia del recubrimiento.

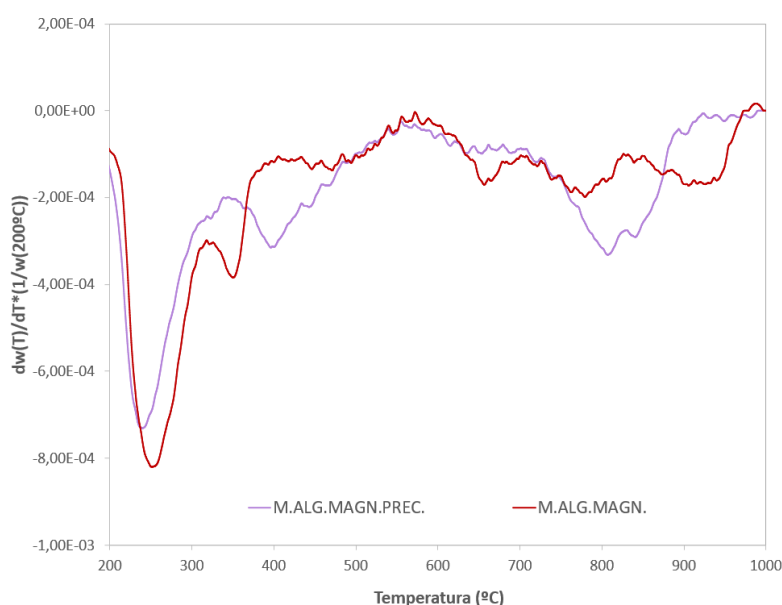


Figura 16. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN. y M.ALG.MAGN.PREC.

En la Figura 17 se muestra la derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC. y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA). Con este ensayo se pretendía demostrar la presencia de la SF en las microesferas. Para ello, se ha comparado con la derivada de la caída del peso en seco de la SF pura. Se ha visto que la SF presenta un pico de degradación característico alrededor de 300°C (Pandey *et al.*, 2020). Se ha empleado una curva de distribución normal para observar de manera más visual dónde se encuentra la pérdida de peso y poder cuantificarla. Puede observarse que las microesferas presentan una primera caída a 247°C correspondiente al alginato, y otra de

menor intensidad en 297°C que se ajusta a una gaussiana, y se corresponde a la SF. A partir del área de dicho pico, se calculó la fracción de SF degradada para esta temperatura. La SF pura a 291°C había perdido el 37% de su peso, y las microesferas habían perdido un 16,5% de su peso en este intervalo de temperatura. Por lo tanto, al aplicar la Eq.2 se calcula que el contenido de SF en la microesfera funcionalizada es del 44%. Se trata de un valor muy alto para un recubrimiento, pero hay que notar que el cuerpo de la microesfera está formado a partir de una disolución al 1.5% p/v en alginato, y la masa de alginato (que es el componente mayoritario) en el cuerpo de la microesfera es muy pequeña, y gran parte del mismo ya se había degradado a 297°C. Además, la cantidad de injerto de SF no es comparable a la de PLL o CS, debido al mayor tiempo de incubación. Este efecto también se había apreciado visualmente con las imágenes de CRYO-FESEM (Figura 13).

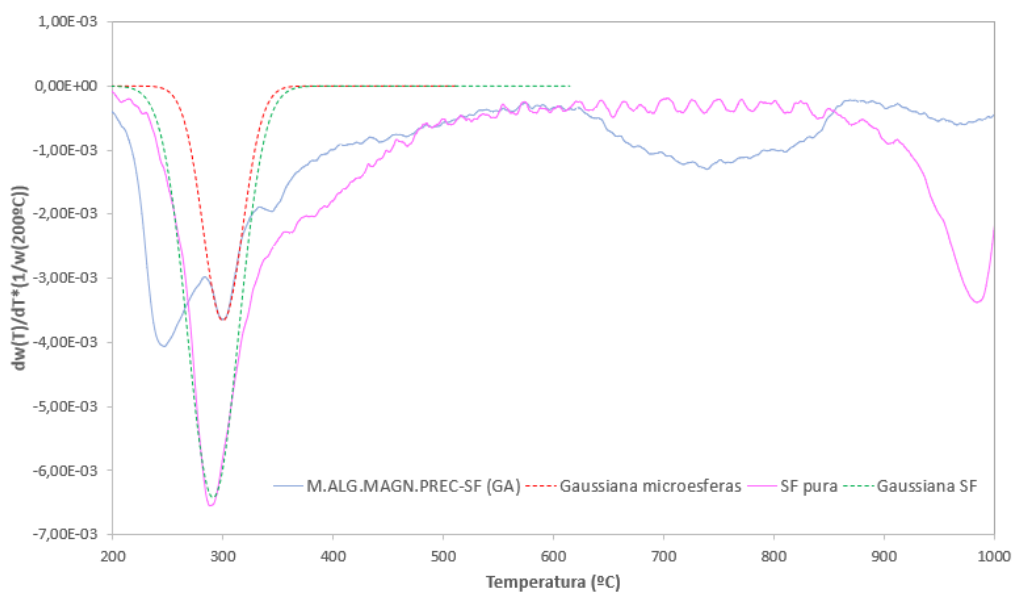


Figura 17. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA) y la SF pura con ajuste a una gaussiana.

Si se compara la degradación térmica de las microesferas magnéticas entre los distintos métodos de injerto de SF (Figuras 31-33 del apartado 7.4 del Anexo) se puede apreciar que este pico característico de la SF cercano a 300°C, no está presente. Únicamente se observa una ligera caída de peso alrededor de 285°C en las M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF (Figura 31). Esto coincide con los resultados del FTIR, ya que los protocolos de deposición de SF con EDC/NHS no parecen habernos permitido demostrar la presencia de SF en las microesferas funcionalizadas; pero los de GA, sí, especialmente el de entrecruzamiento tras la adsorción en la superficie.

#### 4.5. MICROESFERAS DE FIBROÍNA DE SEDA

Se está persiguiendo cada vez más el desafío de generar nano o micropartículas de fibroína finas y uniformes (Kundu *et al.*, 2013). Haciendo una revisión bibliográfica, casi todas las investigaciones con SF se han centrado en el desarrollo de nanofibras mediante *electrospinning*. No hay muchos autores que hayan conseguido desarrollar microesferas usando este biomaterial. Por esta razón, una de nuestras propuestas iniciales fue tratar de generarlas mediante microfluídica. Nos basamos en el protocolo descrito por Breslauer *et al.*, 2010 y se procedió según lo explicado en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. Se probó a dejar las microesferas *overnight* en metanol porque se ha demostrado que la adición de sustancias alcohólicas sobre partículas de SF promueve su cristalización debido a la transición de formación

de hojas  $\beta$  (Nam & Hwan Park, 2001). Breslauer *et al.*, (2010) definieron que esta solución colectora podía basarse en metanol limpio, etanol o isopropanol. Tras tener *overnight* las microesferas en el baño de metanol se hicieron lavados con etanol limpio y se observaron con el microscopio invertido (Figura 18).

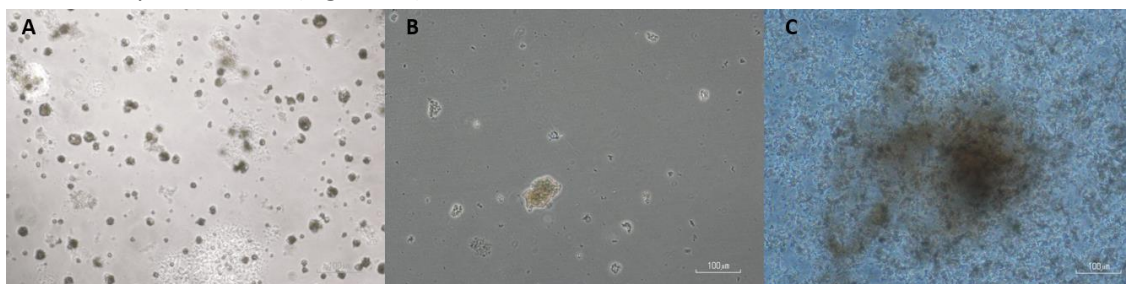


Figura 18. Micropartículas de SF: A) A la salida del sistema de microfluídica; B) Tras *overnight* en metanol; C) Tras lavados con etanol 98%. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ .

Puede verse que las micropartículas recién formadas tras su salida del circuito de microfluídica (Figura 18A), a pesar de presentar bastante dispersión de tamaño, tienen forma esférica. Parece haber solidificado bastante la SF porque el metanol de la fase continua ha inducido su cristalización (Breslauer *et al.*, 2010). Para asegurar la cristalización completa de las microesferas se dejaron en metanol hasta el día siguiente. En la Figura 18B se observa que aunque las microesferas hayan cristalizado, han perdido su morfología esférica, e incluso se han empezado a disgregar, lo que indica que la estabilidad se está viendo comprometida. Dado que el metanol es un disolvente altamente peligroso por su citotoxicidad, es necesario hacer lavados para eliminarlo. Se realizaron lavados con ETOH y se dejaron *overnight* en etanol limpio. En la Figura 18C se puede ver que las micropartículas de fibroína se han disgregado casi por completo, perdiendo su conformación, estabilidad y deshaciéndose. El paso de retirar el metanol es estrictamente necesario porque las microesferas tienen que ser aptas para su uso, no pueden resultar citotóxicas. Se probó a inducir directamente la cristalización con etanol 98% sustituyendo el baño de metanol, tras la salida de las microesferas del sistema de microfluídica, pero el resultado fue muy similar al obtenido en la Figura 18C. Debido a la peligrosidad del metanol y falta de consistencia de estas micropartículas en ETOH y agua, se decidió no continuar con ellas en el ensayo de estabilidad previo al cultivo celular.

#### 4.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE ALGINATO-FIBROÍNA DE SEDA (M.ALG-SF)

Como no se pudo seguir trabajando con las microesferas de fibroína (por lo discutido en el apartado anterior) decidimos tratar de sintetizarlas por microfluídica a partir de un material base más estudiado, que fue el alginato. Estas M.ALG-SF se realizaron según lo descrito en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos y se observaron por microscopía óptica. Para demostrar la presencia de ambos biomateriales se realizó un FTIR y un TGA.

##### 4.6.1. Microscopía óptica

Una vez sintetizadas se indujo el entrecruzamiento y cristalización de la SF mediante EDC/NHS y GA. Al aplicarse estos tratamientos de *crosslinking*, se puede observar que el interior de la microesfera cambia de coloración, aparecen poros y pequeñas motas debido a la SF reticulada en el interior (Figura 19).



Figura 19. Microesferas de alginato-fibroína de seda: A) Tras su síntesis; B) Tras inducir la cristalización con etanol y EDC/NHS overnight; C) Tras inducir la cristalización con GA y Gly overnight. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6.2. FTIR

Se realizó un FTIR comparando los espectros de las M.ALG-SF (GA), M.ALG-SF(EDC/NHS) con el de la SF pura y el de las M.ALG (Figura 20). Debido a que la base de la microesfera es el alginato y es el componente que se encuentra en mayor proporción, el espectro resultante de las M.ALG-SF es muy similar al de las M.ALG, pero con algunas peculiaridades correspondientes a la SF.

La banda ancha en  $1624\text{ cm}^{-1}$  presente en las M.ALG se hace más pronunciada y estrecha en las microesferas que contienen SF, debido a la presencia de grupos carbonilo que reducen la anchura del pico (Zhang *et al.*, 2012). Este efecto se observa tanto en las microesferas entrecruzadas con EDC/NHS como con GA. También aparece la tendencia a formar el segundo pico característico de la SF, habiendo una caída en  $1519\text{ cm}^{-1}$  debido a la presencia de uniones entre aminas (N-H) (Zhang *et al.*, 2012), un poco más brusca en el caso del entrecruzamiento con GA. El segundo pico característico del alginato ( $1414\text{ cm}^{-1}$ ) en estas microesferas no es tan pronunciado, llegando prácticamente a desaparecer en las entrecruzadas con EDC/NHS. Además, las vibraciones debidas al estiramiento nitrilo (C-N) ( $1230\text{-}1189\text{ cm}^{-1}$ ) también aparecen reflejadas, por lo que se confirma la presencia de SF en las microesferas.

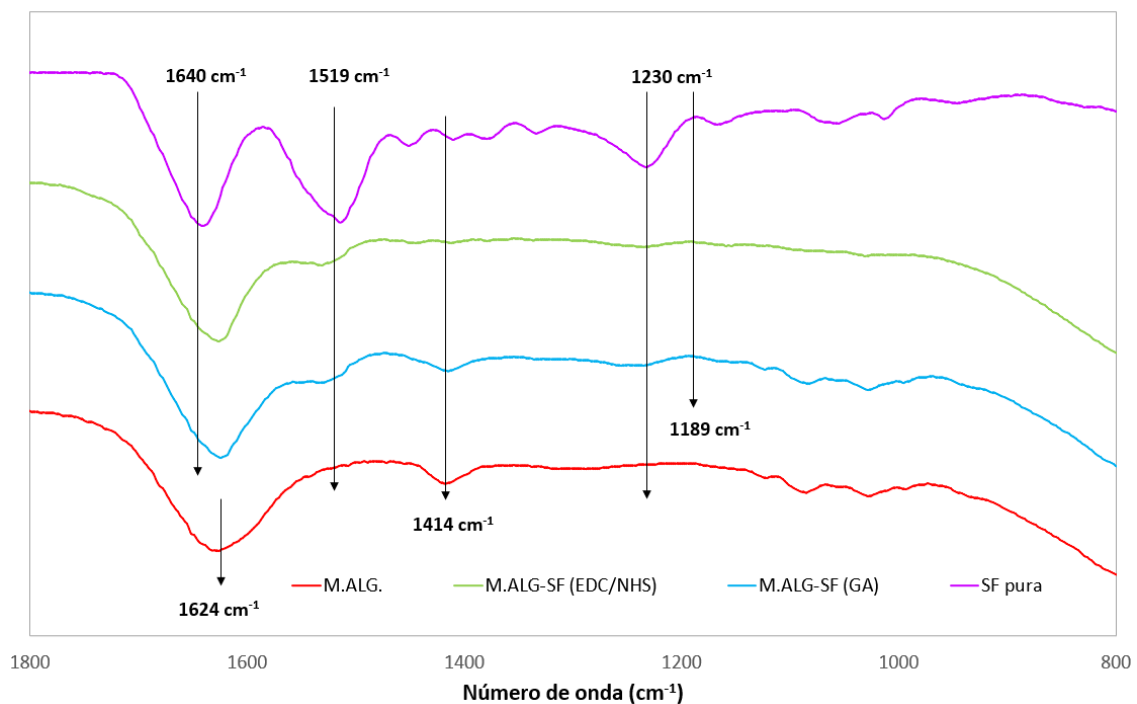


Figura 20. Espectros FTIR de las M.ALG-SF(GA), M.ALG-SF(EDC/NHS), M.ALG y SF pura

### 4.6.3. TGA

En la Figura 21 se muestra la derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG-SF. Para demostrar la presencia de SF en ellas, se ha comparado con la derivada de la caída del peso en seco de la SF pura y se ha ajustado a una gaussiana. Se aprecia una primera caída a 242°C que se corresponde al alginato y otra en 297°C, perteneciente a la SF. Aplicando la Eq.2 se calculó la fracción de SF degradada a 297°C, que en este caso fue de un 62%. Esta fracción es más alta que en el caso de las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) porque ahora las microesferas no constan del recubrimiento que podría influir, se había aumentado la concentración de SF, y además una gran parte del alginato que las conformaba ya se había degradado a esa temperatura.

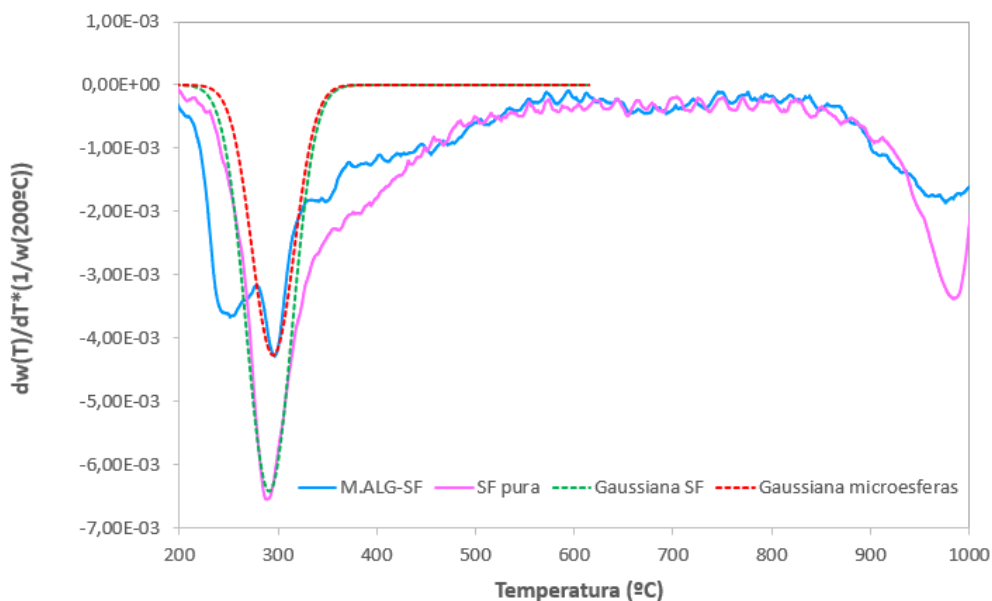


Figura 21. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG-SF y SF pura con ajuste a una gaussiana.

### 4.7. ENSAYO DE ESTABILIDAD

Este ensayo busca conocer la estabilidad de las microesferas que se pretenden utilizar como microgel en el medio estándar de MM (RPMI 1640). Como se ha comentado en el apartado 3.10 de Materiales y Métodos, se probaron las M.ALG.MAGN.PREC (utilizadas como control) y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA); además de las M.ALG-SF(GA) y las M.ALG-SF(EDC/NHS). En estas últimas se hizo un tratamiento de resistencia con EDTA (quelante del calcio) para ver si se podía eliminar el alginato de la microesfera y quedarnos solo con una estructura esférica pura de SF.

Las M.ALG.MAGN.PREC y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) resultaron estables en el medio de cultivo. Puede observarse en la Figura 22 que la morfología se mantiene y que las microesferas no se deshicieron con el tiempo. En cambio, en el caso de las M.ALG-SF entrecruzadas mediante los dos métodos distintos, no sucede lo mismo. La SF parece estar dentro de las microesferas formando agregados y tampoco se detectan bien los límites de estas microesferas. En el segundo día de inmersión se percibe que el interior de la microesfera ha cambiado, aspecto que se confirma observándolas en el quinto día. Por lo que se deduce de la Figura 22, a medida que pasa el tiempo en el medio de cultivo, el contenido de alginato de la microesfera se va perdiendo porque no está retenido por el reforzamiento del LbL (como sí sucede en las dos que llevan la precapa). Al perderse la matriz de alginato, los agregados de SF se liberan y se dispersan por el medio de cultivo. Esto imposibilita su uso en cultivo, pero que contengan SF sí que pueden utilizarse las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) porque resultaron ser estables en RPMI 1640.



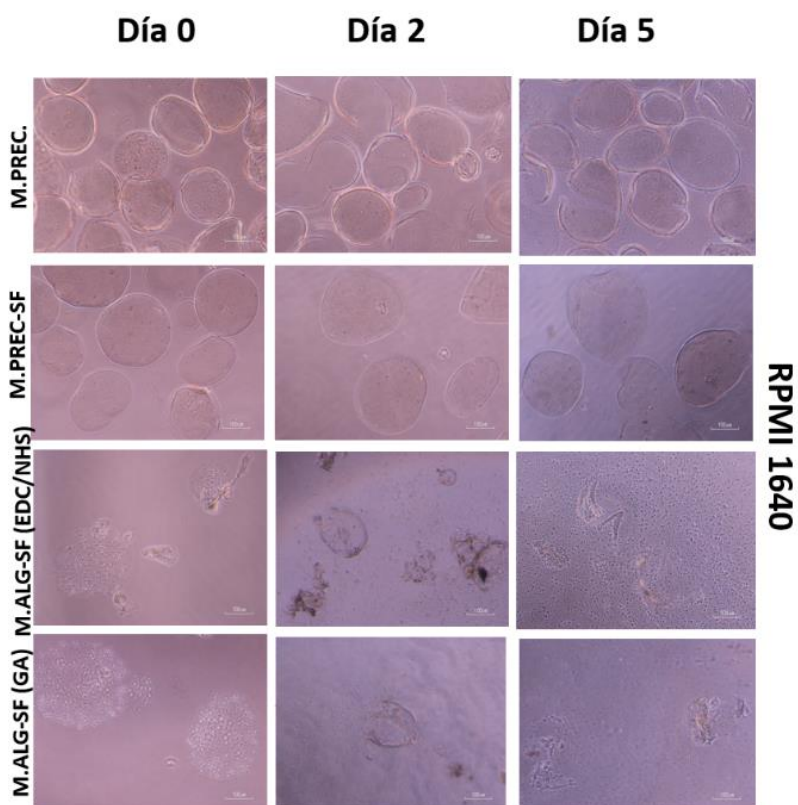


Figura 22. M.ALG.MAGN.PREC, M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA), M.ALG-SF(EDC/NHS), M.ALG-SF(GA) en medio de cultivo RPMI 1640 a 0, 2 y 5 días. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Luego, en la prueba con EDTA para eliminar el alginato de las M.ALG-SF (Figura 23), se pretendía usar el alginato inicialmente para proveerle a la SF una manera de conformar las microesferas y además poderse entrecruzar fácilmente. Sin embargo, este alginato no interesa de cara al cultivo celular porque impide que la SF esté disponible para interactuar con las MMC. Por ello, se intentó ver si las microesferas resistirían un tratamiento con EDTA de 5 días que eliminase el alginato.

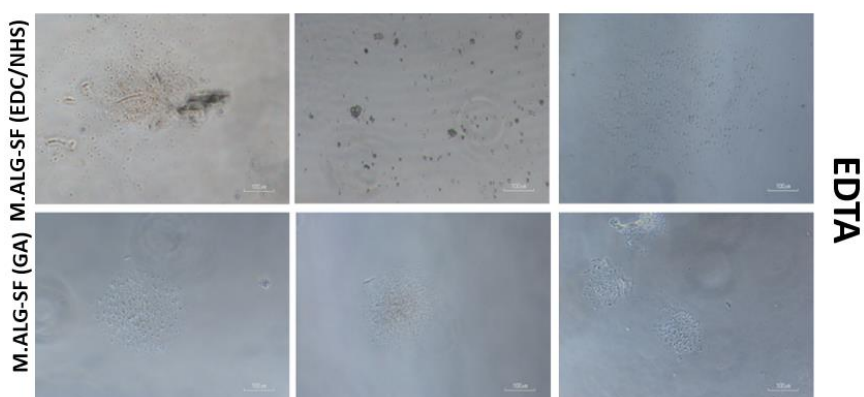


Figura 23. M.ALG-SF(EDC/NHS) y M.ALG-SF(GA) en EDTA a 0, 2 y 5 días. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Viendo las imágenes de la Figura 23 se deduce que el tratamiento con EDTA no ha funcionado. Las hipótesis que se barajan para solucionar el resultado de este tratamiento son que haría falta una mayor cantidad de SF inicial en las microesferas para que no solo se formasen agregados, y que hubiese un mayor grado de compactación; emplear una menor cantidad de alginato; o que el tratamiento del alginato con EDTA no fuese tan brusco, es decir, probar a diluirlo.

#### 4.8. CULTIVO CELULAR

Dado que las M.ALG.MAGN.PREC y las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA) resultaron ser las más estables en el medio de cultivo RPMI 1640, fueron las elegidas para la generación de la plataforma de cultivo. En ella se utilizaron los siguientes parámetros: 25 rpm,  $\pm 50^\circ$  de oscilación, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 37°C. Con este ensayo se pretende comparar el efecto de la funcionalización e injerto de SF en las microesferas en las MMC, además de descartar que el hecho de haber realizado el *crosslinking* con GA haya vuelto citotóxicas a las microesferas. Para evaluar la viabilidad y proliferación celular se realizó un ensayo MTS a 1 y 3 días. Este ensayo permite correlacionar la absorbancia con la población celular en cada condición y tiempo.

En la Figura 24 se representa el recuento celular para cada una de las condiciones, con barras de error que indican la desviación estándar de las cuatro réplicas biológicas y dos técnicas. Inicialmente, cada criotubo contenía 60.000 células. Como se puede observar, tras las 24h de la siembra del microgel, las células han proliferado en las 3 condiciones. La población celular en la suspensión se había triplicado, mientras que en las M.ALG.MAGN.PREC (usadas como control) y en las M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA), el número de células apenas se había duplicado con respecto al inicio. Esto no significa que la plataforma de cultivo no sea adecuada para las MMC o que las afecte negativamente, sino que el microgel ha retrasado el inicio de la proliferación. Este hecho se demuestra haciendo un seguimiento del cultivo, midiendo la población celular a 72h.

Al estudiar la proliferación celular a los 3 días de la siembra, se puede observar como las RPMI 8226 han incrementado su población de manera estadísticamente significativa en los microgeles (Figura 24). Además, no hay diferencias estadísticamente significativas en términos de proliferación entre las distintas condiciones, hecho que sí se apreciaba en el primer día de cultivo. Esto refuerza la teoría inicial de que, aunque al inicio del cultivo las RPMI 8226 tardaran en adaptarse a los microgeles, con el aumento del tiempo las células se adaptan a la plataforma e igualan en número a la población en suspensión para un mismo momento. Tras los 3 días de cultivo celular, se puede apreciar que la población roza las 300.000 células en todos los casos, quintuplicando la densidad inicial. Además el aumento sí es significativo en el caso de los microgeles, ya que el número de células casi se ha triplicado con respecto al día 1 de cultivo. Los resultados del análisis estadístico del MTS se muestran en la Tabla 4 del apartado 7.5 del Anexo.

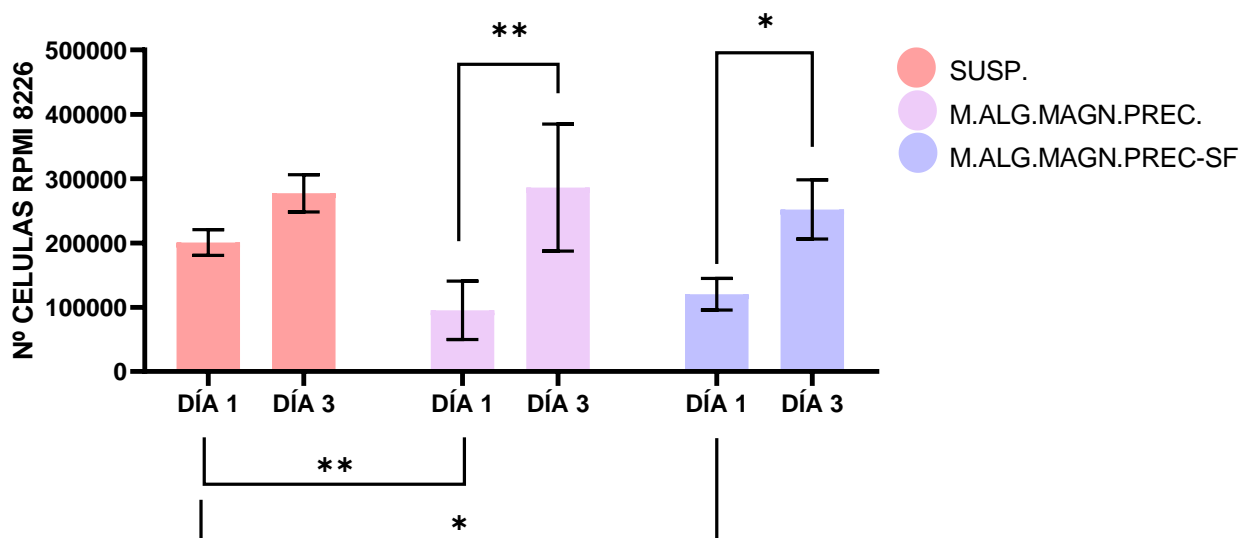


Figura 24. Ensayo MTS de proliferación celular a 1 y 3 días en la suspensión de MMC, los microgeles M.ALG.MAGN.PREC y M.ALG.MAGN.PREC-SF(GA).



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo final de grado son las siguientes:

1. Se han desarrollado microesferas de alginato magnéticas mediante microfluídica estableciéndose en 65 mL/h y 1,55 mL/h los valores de flujo óptimos.
2. Se ha establecido que la concentración de nanopartículas magnéticas óptima para el modelo de cultivo es del 5% p/p con respecto al alginato.
3. El recubrimiento con multicapas de PLL y CS por LbL se ha depositado adecuadamente en las microesferas de alginato magnéticas permitiendo su reforzamiento. Se ha logrado detectar la presencia de la precapa y del injerto de fibroína de seda mediante técnicas de caracterización fisicoquímicas.
4. La fibroína de seda se ha podido injertar sobre la superficie de las microesferas funcionalizadas con la precapa mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído. Además, estas microesferas han resultado estables en medio de cultivo.
5. La plataforma de cultivo desarrollada ha permitido mantener la suspensión y proliferación celular, sin verse afectada por los biomateriales utilizados.
6. Se han sintetizado microesferas a partir de mezclas de fibroína de seda y alginato que han logrado reticular y caracterizarse. Como estrategia de futuro se plantea la síntesis de las mencionadas microesferas empleando diferentes proporciones de ambos biomateriales, así como lograr su resistencia en medio de cultivo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, D. D., MINK, P. J., ADAMI, H.-O., COLE, P., MANDEL, J. S., OKEN, M. M., & TRICHOPOULOS, D. (2007). Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer*, *120*, 40–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.22718>
- ALLEGRA, A., INNAO, V., GAETANO ALLEGRA, A., PUGLIESE, M., DI SALVO, E., VENTURA-SPAGNOLO, E., MUSOLINO, C., GANGEMI, S., ADULTHOOD, IN, & BARRESI, G. (2019). *Molecular Sciences Lymphocyte Subsets and Inflammatory Cytokines of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma*. <https://doi.org/10.3390/ijms20112822>
- ANAND PADALA, S., BARSOUK, A., BARSOUK, A., RAWLA, P., VAKITI, A., KOLHE, R., KOTA, V., & HAILEGIORGIS AJEBO, G. (2021). *Medical sciences Review Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma*. <https://doi.org/10.3390/medsci90110003>
- ANDRADE, R. G. D., VELOSO, S. R. S., & CASTANHEIRA, E. M. S. (2020). *Molecular Sciences Shape Anisotropic Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.3390/ijms21072455>
- ARKHANGELSKIY, A., MANIGLIO, D., BUCCIARELLI, A., YADAVALLI, V. K., & QUARANTA, A. (2021). *Plasma-Assisted Deposition of Silk Fibroin on Different Surfaces*. <https://doi.org/10.1002/admi.202100324>
- BART, J., TIGGELAAR, R., YANG, M., SCHLAUTMANN, S., ZUILHOF, H., & GARDENIERS, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, *9*, 3481–3488. <https://doi.org/10.1039/b914270c>
- BAYBAŞ, D., SERDAROĞLU, G., & SEMERCI, B. (2021). The composite microbeads of alginate, carrageenan, gelatin, and poly(lactic-co-glycolic acid): Synthesis, characterization and Density Functional Theory calculations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 322–338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.128>
- BEĆ, K. B., GRABSKA, J., & HUCK, C. W. (2020). Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy – A review. *Analytica Chimica Acta*, *1133*, 150–177. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.04.015>
- BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M., ZHAN, F., SAWYER, J., BARLOGIE, B., & SHAUGHNESSY, J. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0034>

- BRESLAUER, D. N., MULLER, S. J., & LEE, L. P. (2010). Generation of Monodisperse Silk Microspheres Prepared with Microfluidics. *Biomacromolecules*, *11*(3), 643–647. <https://doi.org/10.1021/bm901209u>
- BRIGLE, K., & ROGERS, B. (2017). Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, *33*(3), 225–236. <https://doi.org/10.1016/J.SONCN.2017.05.012>
- 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/https://doi.org/10.1002/adfm.201907670>
- CAO, Y., & WANG, B. (2009). Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int. J. Mol. Sci*, *10*, 1514–1524. <https://doi.org/10.3390/ijms10041514>
- CARLOS MARÍN-PAYÁ, J., DÍAZ-BENITO, B., MARTINS, L. A., TRUJILLO, S. C., CORDÓN, L., LANCEROS-MÉNDEZ, S., FERRER, G. G., SEMPERE, A., LUIS, J., RIBELLES, G., & BORZACCHIELLO, A. (2021). Biomimetic 3D Environment Based on Microgels as a Model for the Generation of Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma14237121>
- CARVALHO, B. G., VIT, F. F., CARVALHO, H. F., HAN, S. W., & DE LA TORRE, L. G. (2022). Layer-by-Layer Biomimetic Microgels for 3D Cell Culture and Nonviral Gene Delivery. *Biomacromolecules*, *23*(4), 1545–1556. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01130>
- CHIECCHIO, L., CYTOGENETICS, M., DAGRADA, G. P., IBRAHIM, A. H., CABANAS, E. D., PROTHEROE, R. K. M., STOCKLEY, D. M., ORCHARD, K. H., CROSS, N. C. P., HARRISON, C. J., & ROSS, F. M. (2009). Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*. *94*(12), 1708–1713. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.011064>
- CHNG, W. J., HUANG, G. F., CHUNG, T. H., NG, S. B., GONZALEZ-PAZ, N., TROSKA-PRICE, T., MULLIGAN, G., CHESI, M., BERGSAGEL, P. L., & FONSECA, R. (2011). Clinical and Biological Implications of MYC Activation: A common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.53>
- CHOE, G., PARK, J., PARK, H., & LEE, J. Y. (2018). Hydrogel Biomaterials for Stem Cell Microencapsulation. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym10090997>
- CLARA-TRUJILLO, S., TOLOSA, L., CORDÓN, L., SEMPERE, A., GALLEGO FERRER, G., & GÓMEZ RIBELLES, J. L. (2022). Novel microgel culture system as semi-solid three-dimensional in vitro model for the study of multiple myeloma proliferation and drug resistance. *Biomaterials Advances*, *135*, 212749. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2022.212749>
- DE BLASIO, C. (2019). Thermogravimetric Analysis (TGA). In C. de Blasio (Ed.), *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology* (pp. 91–102). *Springer International Publishing*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9_7)
- DE LA PUENTE, P., MUZ, B., GILSON, R. C., AZAB, F., LUDERER, M., KING, J., ACHILEFU, S., VIJ, R., & AZAB, A. K. (2015). 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma HHS Public Access. *Biomaterials*, *73*, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.017>
- DENDUKURI, D., TSOI, K., HATTON, T. A., & DOYLE, P. S. (2005). Controlled synthesis of nonspherical microparticles using microfluidics. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, *21*(6), 2113–2116. <https://doi.org/10.1021/la047368k>
- DE VILLIERS, M. M., OTTO, D. P., STRYDOM, S. J., & LVOV, Y. M. (2011). Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Advanced drug delivery reviews*, *63*(9), 701–715. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.011>
- DRACHUK, I., CALABRESE, R., HARBAUGH, S., KELLEY-LOUGHNANE, N., KAPLAN, D. L., STONE, M., & TSUKRUK, V. V. (2015). Silk Macromolecules with Amino Acid-Poly(Ethylene Glycol) Grafts for Controlling Layer-by-Layer Encapsulation and Aggregation of Recombinant Bacterial Cells. <https://doi.org/10.1021/nn504890z>
- DUCKER, R. E., MONTAGUE, M. T., & LEGGETT, G. J. (2008). A comparative investigation of methods for protein immobilization on self-assembled monolayers using glutaraldehyde, carbodiimide, and anhydride reagents. *Biointerphases*, *3*(3), 59–65. <https://doi.org/10.1116/1.2976451>

- FERRARINI, M., STEIMBERG, N., BONIOTTI, J., BERENZI, A., BELLONI, D., MAZZOLENI, G., & FERRERO, E. (2017). 3D-Dynamic Culture Models of Multiple Myeloma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1612, 177–190. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_13)
- FU, H.-X., LI, H., WU, L.-L., ZHAO, Y.-Z., XU, Y.-Y., ZHU, Y.-L., XUE, S.-L., WANG, D.-W., LIU, C., YANG, S.-L., & LI, X.-K. (2014). Preparation and microscopy examination of alginate-poly-l-lysine-alginate microcapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(11), 1523–1529. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.836212>
- FURUKAWA, Y., & KIKUCHI, J. (2020). Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 111, 496–511. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02829-6>
- GAÑÁN-CALVO, A. M., & GORDILLO, J. M. (2001). Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. *Physical Review Letters*, 87(27), 274501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.274501>
- GANAPATHE, L. S., MOHAMED, M. A., YUNUS, R. M., & DURYHA BERHANUDDIN, D. (2020.). Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. *Magnetochemistry*. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6040068>
- GLOBOCAN, 2020. Multiple myeloma. *Global Cancer Observatory*. Retrieved Jun 30, 2022 from: <https://gco.iarc.fr/>
- GRABSKA-ZIELIŃSKA, S., SIONKOWSKA, A., CARVALHO, Â., & MONTEIRO, F. J. (2021). Biomaterials with potential use in bone tissue regeneration-collagen/chitosan/silk fibroin scaffolds cross-linked by EDC/NHS. *Materials*, 14(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/MA14051105>
- GRUJIĆ, A., ČOŠOVIĆ, V., STAJIĆ-TROŠIĆ, J., ČOŠOVIĆ, A., STIJEPOVIĆ, M., PUTIĆ, L., & ŽÁK, T. (2018). Synthesis of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanofibers by joint sol-gel and electrospinning technique. *Metallurgical and Materials Engineering*, 24(3), 173–180. <https://doi.org/10.30544/387>
- HAM, J., LEVER, L., FOX, M., & REAGAN, M. R. (2019). *In Vitro 3D Cultures to Reproduce the Bone Marrow Niche*. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10228>
- HOPWOOD, D., ALLEN, C. R., & MCCABE, M. (1970). The reactions between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics. *The Histochemical Journal*, 2(2), 137–150. <https://doi.org/10.1007/BF01003541>
- INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION. (n.d). *International Myeloma Working Group (IMWG) criteria for the diagnosis of Multiple Myeloma*. Retrieved Jun 30, 2022 from <https://www.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-diagnosis-multiple-myeloma>
- KACHI, W., AL-SHAMMARI, A. M., & ZAINAL, I. G. (2019). Cobalt Ferrite Nanoparticles: Preparation, characterization and salinized with 3-aminopropyl triethoxysilane. *Energy Procedia*, 157, 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.300>
- KUMAR, S. K., RAJKUMAR, V., KYLE, R. A., VAN DUIN, M., SONNEVELD, P., MATEOS, M. V., GAY, F., & ANDERSON, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- KUNDU, B., RAJKHOWA, R., KUNDU, S. C., & WANG, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>
- KYLE, R. A., & RAJKUMAR, S. V. (2008). Multiple myeloma. *Blood*, 111(6), 2962–2972. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-10-078022>
- LANCASHIRE, R. (2011). Chemistry of Garments: Animal Fibres. Retrieved July 3, 2022, from [http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Textiles/Animal\\_Fibres.html](http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Textiles/Animal_Fibres.html)
- LESBAYEV, A. B., ELOUADI, B., LESBAYEV, B. T., MANAKOV, S. M., SMAGULOVA, G. T., & PRIKHODKO, N. G. (2017). Obtaining of Magnetic Polymeric Fibers with Additives of Magnetite Nanoparticle. *Procedia Manufacturing*, 12, 28–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.08.005>
- LI, G., & SUN, S. (2022). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 27(9), 2757. <https://doi.org/10.3390/molecules27092757>
- LI, W., LEE, H., WEITZ, D. A., ZHANG, L., GE, X., XU, B., ZHANG, W., QU, L., CHOI, C.-H., XU, J., & ZHANG, A. (2018). Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications Microfluidic fabrication of

- microparticles for biomedical applications *Chem Soc Rev Chemical Society Reviews*, 47, 5646–5683. <https://doi.org/10.1039/c7cs00263g>
- MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., & WALDRON, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>
- MIKAMI, T., & KITAGAWA, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(10), 4719–4733. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>
- MING, J., JIANG, Z., WANG, P., BIE, S., & ZUO, B. (2015). Silk fibroin/sodium alginate fibrous hydrogels regulated hydroxyapatite crystal growth. *Materials Science and Engineering: C*, 51, 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.03.014>
- MING, J., PAN, F., & ZUO, B. (2021). Structure and properties of protein-based fibrous hydrogels derived from silk fibroin and sodium alginate. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3662-z>
- NAM, J., & HWAN PARK, Y. (2001). Morphology of Regenerated Silk Fibroin: Effects of Freezing Temperature, Alcohol Addition, and Molecular Weight. In *J Appl Polym Sci* (Vol. 81).
- NIMESH, S. (2013). Poly-L-lysine nanoparticles. *Gene Therapy*, 147–162. <https://doi.org/10.1533/9781908818645.147>
- NISISAKO, T., OKUSHIMA, S., & TORII, T. (2005). Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. <https://doi.org/10.1039/b501972a>
- NOGUEIRA, G. M., DE MORAES, M. A., RODAS, A. C. D., HIGA, O. Z., & BEPPU, M. M. (2011). Hydrogels from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial perspective. *Materials Science and Engineering: C*, 31(5), 997–1001. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2011.02.019>
- OKUDA, K., URABE, I., YAMADA, Y., & OKADA, H. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(2), 100–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90231-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90231-5)
- PANDEY, V., HAIDER, T., JAIN, P., GUPTA, P. N., & SONI, V. (2020). Silk as a leading-edge biological macromolecule for improved drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101294>
- PILLAI, M. M., GOPINATHAN, J., INDUMATHI, B., MANJOOSHA, Y. R., SANTOSH SAHANAND, K., DINAKAR RAI, B. K., SELVAKUMAR, R., & BHATTACHARYYA, A. (2016). Silk-PVA Hybrid Nanofibrous Scaffolds for Enhanced Primary Human Meniscal Cell Proliferation. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9932-z>
- PRITCHARD, E. M., & KAPLAN, D. L. (2011). Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(6), 797–811. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.568936>
- QIAO, F., ZHANG, J., WANG, J., DU, B., HUANG, X., PANG, L., & ZHOU, Z. (2017). Silk fibroin-coated PLGA dimpled microspheres for retarded release of simvastatin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.038>
- QIAO, X., MILLER, R., SCHNECK, E., & SUN, K. (2020). Influence of pH on the surface and foaming properties of aqueous silk fibroin solutions. *Soft Matter*, 16(15), 3695–3704.
- RAJKUMAR, S. V., & KUMAR, S. (2016). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic proceedings*, 91(1), 101–119. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>
- RANA, D., & LEENA, M. (2016). Surface Functionalization of Nanobiomaterials for Application in Stem Cell Culture, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine. <https://doi.org/10.1002/btpr.2262>
- REAGAN, M. R., MISHIMA, Y., GLAVEY, S. V., ZHANG, Y., MANIER, S., LU, Z. N., MEMARZADEH, M., ZHANG, Y., SACCO, A., ALJAWAI, Y., SHI, J., TAI, Y. T., READY, J. E., KAPLAN, D. L., ROCCARO, A. M., & GHOBRIAL, I. M. (2014). Investigating osteogenic differentiation in Multiple Myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood*, 124(22), 3250–3259. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-558007>
- REAGAN, M. R., SEIB, F. P., MCMILLIN, D. W., SAGE, E. K., MITSIADES, C. S., JANES, S. M., GHOBRIAL, I. M., & KAPLAN, D. L. (2012). Stem Cell Implants for Cancer Therapy: TRAIL-Expressing Mesenchymal Stem Cells

- Target Cancer Cells In Situ. *Journal of breast cancer*, 15(3), 273–282. <https://doi.org/10.4048/jbc.2012.15.3.273>
- RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J., & MINOR, L. (2013). Cell Viability Assays. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- ROCKWOOD, D. N., PREDA, R. C., WANG, X., LOVETT, M. L., & KAPLAN, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- ROZENBERG, M., & SHOHAM, G. (2007). FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. *Biophysical Chemistry*, 125(1), 166–171. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2006.07.008>
- RUSSO, R., MALINCONICO, M., & SANTAGATA, G. (2007). Effect of Cross-Linking with Calcium Ions on the Physical Properties of Alginate Films. *Biomacromolecules*, 8(10), 3193–3197. <https://doi.org/10.1021/bm700565h>
- SAHOO, D. R., & BISWAL, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>
- SARALIDZE, K., KOOLE, L. H., & KNETSCH, M. L. W. (2010). Polymeric Microspheres for Medical Applications. *Materials*, 3, 3537–3564. <https://doi.org/10.3390/ma3063537>
- SUN, J., & TAN, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 6, 1285–1309. <https://doi.org/10.3390/ma6041285>
- UYEN, N. T. T., ABDUL HAMID, Z. A., & NURAZREENA, A. (2019). Fabrication and characterization of alginate microspheres. *Materials Today: Proceedings*, 17, 792–797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.364>
- WALT, D. R., & AGAYN, V. I. (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13(10), 425–430. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85023-2](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85023-2)
- WATANABE, K., SUGIYAMA, K., KOMATSU, S., YOSHIDA, K., ONO, T., FUJIMURA, T., KASHIWAGI, Y., & SATO, K. (2020). Voltammetric pH Measurements Using Azure A-Containing Layer-by-Layer Film Immobilized Electrodes. *Polymers*, 12(10), 2328. <https://doi.org/10.3390/polym12102328>
- WRAY, L. S., HU, X., GALLEGO, J., GEORGAKOUDI, I., OMENETTO, F. G., SCHMIDT, D., & KAPLAN, D. L. (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 99, 89–101. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31875>
- XI, J., QIN, J., & FAN, L. (2012). Chondroitin sulfate functionalized mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5235–5247. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34128>
- YE, X., LI, S., CHEN, X., ZHAN, Y., & LI, X. (2017). Polyethylenimine/silk fibroin multilayers deposited nanofibrics for cell culture. *International journal of biological macromolecules*, 94(Pt A), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.047>
- YAN, S., LI, M., ZHANG, Q. (2013). Blend films based on silk fibroin/hyaluronic acid. *Fibers Polym* 14, 188–194. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-0188-2>
- YAROSLAVOV, A. A., KUCHENKOVA, O. Y., OKUNEVA, I. B., MELIK-NUBAROV, N. S., KOZLOVA, N. O., LOBYSHEV, V. I., MENGER, F. M., & KABANOV, V. A. (2003). Effect of polylysine on transformations and permeability of negative vesicular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1–2), 44–54. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00701-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00701-0)
- ZHANG, H., LI, L., DAI, F., ZHANG, H., NI, B., ZHOU, W., YANG, X., & WU, Y. (2012). Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-117>
- ZHOU, C.-Z., CONFALONIERI, F., JACQUET, M., PERASSO, R., LI, Z.-G., & JANIN, J. (2001). Silk Fibroin: Structural Implications of a Remarkable Amino Acid Sequence.
- ZULUAGA-VÉLEZ, A., QUINTERO-MARTINEZ, A., OROZCO, L. M., & SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C. (2021). Silk fibroin nanocomposites as tissue engineering scaffolds – A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111924. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111924>

## 7. ANEXO

### 7.1. RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS PROMEDIO DE LAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS Y SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Tabla 2. Diámetro y desviación estándar de las microesferas de alginato magnéticas en función de los parámetros de flujo de microfluídica.

FLUJO DISCONTINUO (mL/h)	FLUJO CONTINUO (mL/h)	DIÁMETRO PROMEDIO (μm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (μm)
2	20	334,80	42,13
	40	274,07	34,07
	60	233,32	22,96
	80	216,86	21,49
	100	167,16	29,35
	120	163,28	19,36
1,5	20	264,34	28,78
	40	240,30	21,71
	60	191,06	17,85
	80	177,11	18,19
	100	155,35	27,25
	120	91,45	18,85
1	20	215,19	32,21
	40	189,77	22,87
	60	145,04	21,65
	80	85,26	15,09
	100	72,10	12,77
	120	55,12	5,25

### 7.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE $Fe_3O_4$ EN LAS MICROESFERAS DE ALGINATO

Tabla 3. Resultados del análisis estadístico del ensayo de determinación de la concentración de  $Fe_3O_4$  en las microesferas de alginato. Se muestra el análisis de múltiples comparaciones que indica la significancia estadística entre las muestras.

Número de familias	1
Número de comparaciones por familia	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Column A vs. Column B	-0,5961	-1,296 to 0,1038	No	ns	0,1106
Column A vs. Column C	-2,173	-2,949 to -1,398	Yes	****	<0,0001
Column B vs. Column C	-1,577	-2,277 to -0,8772	Yes	****	<0,0001

### 7.3. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE INCORPORACIÓN DE SF EN LAS MICROESFERAS MEDIANTE FTIR

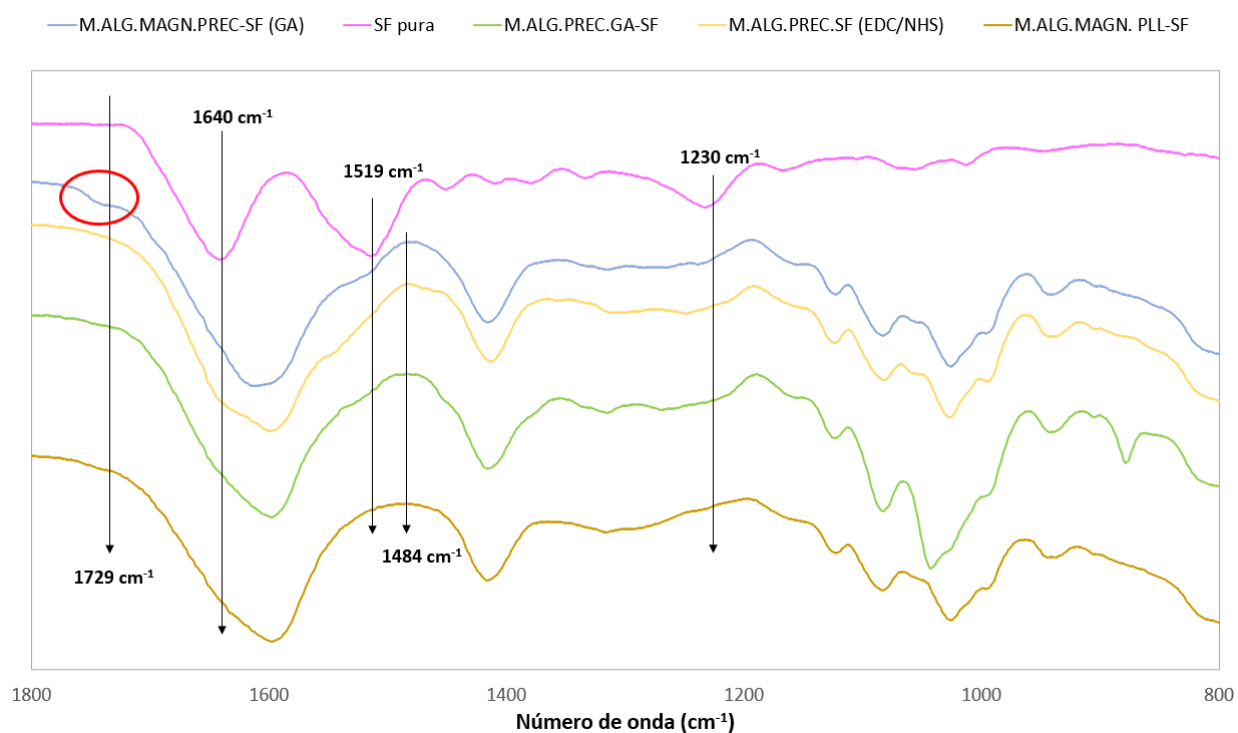


Figura 25. Espectros FTIR complementarios de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA); M.ALG.MAGN.PREC-SF(EDC/NHS); M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF; M.ALG.MAGN.PLL-SF y la SF pura con sus picos característicos.

7.4. FIGURAS COMPLEMENTARIAS DEL ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

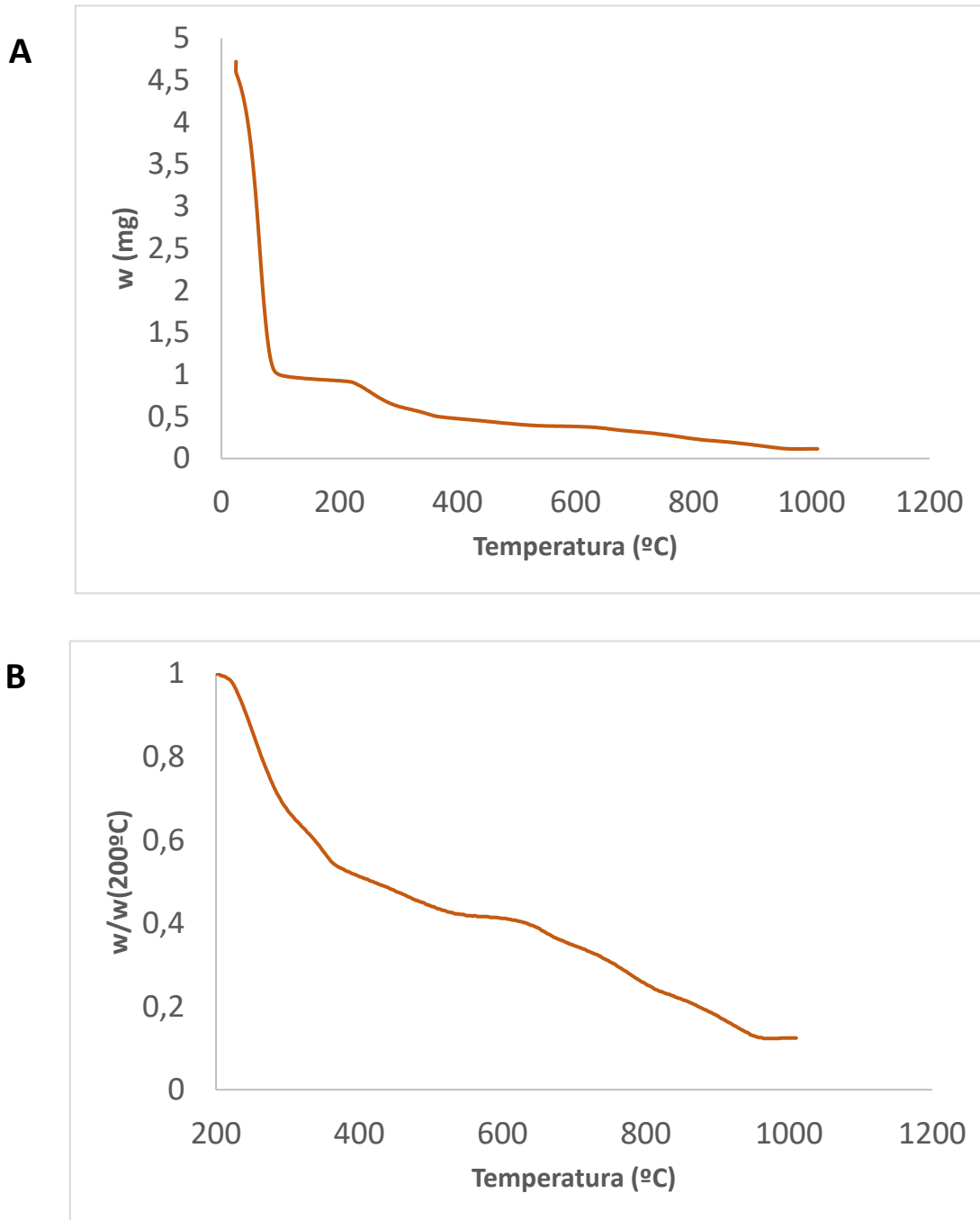


Figura 26. A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN húmedas en el TGA; B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las M.ALG.MAGN.



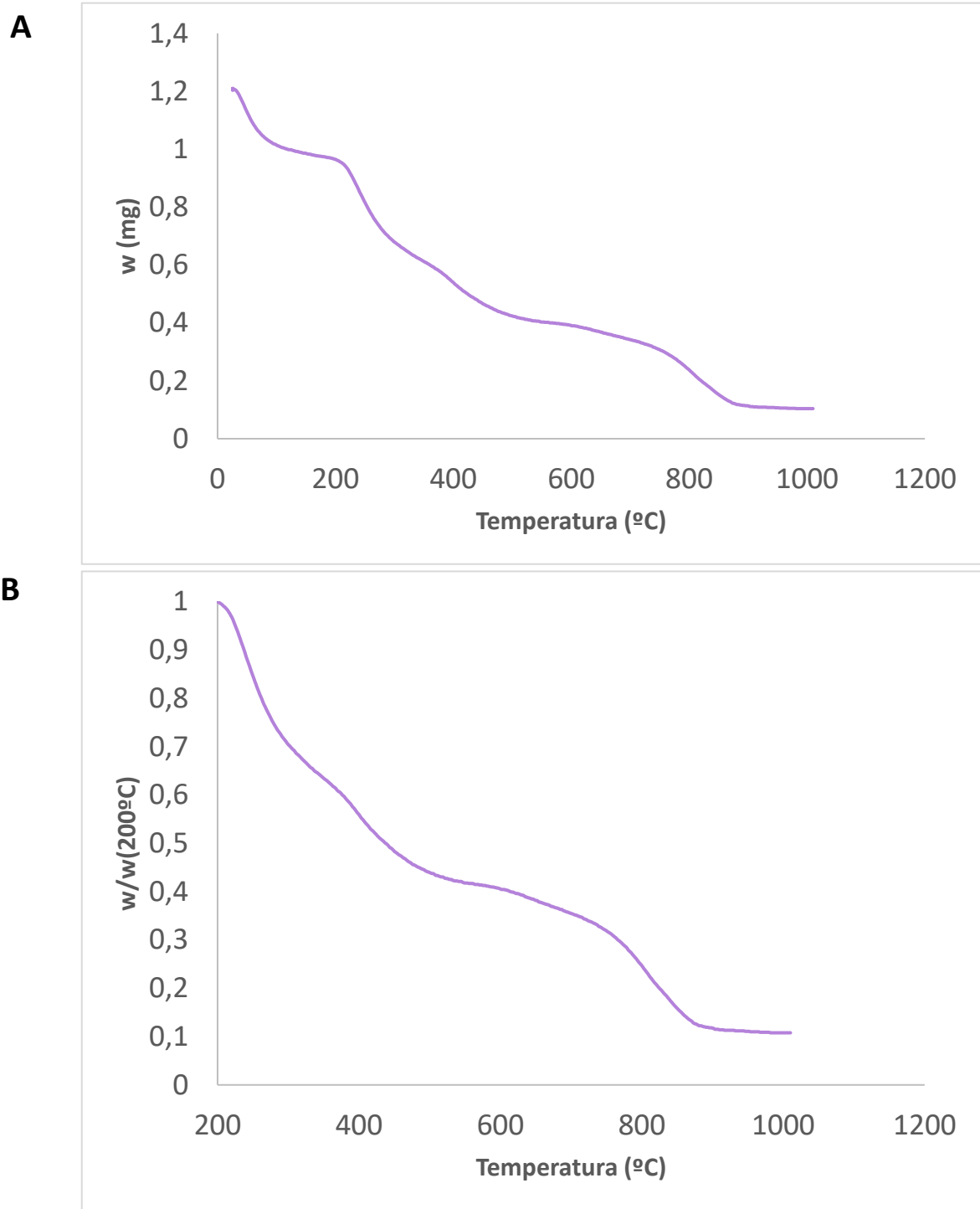


Figura 27. A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN.PREC. húmedas en el TGA; B) Evolución del porcentaje del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC.

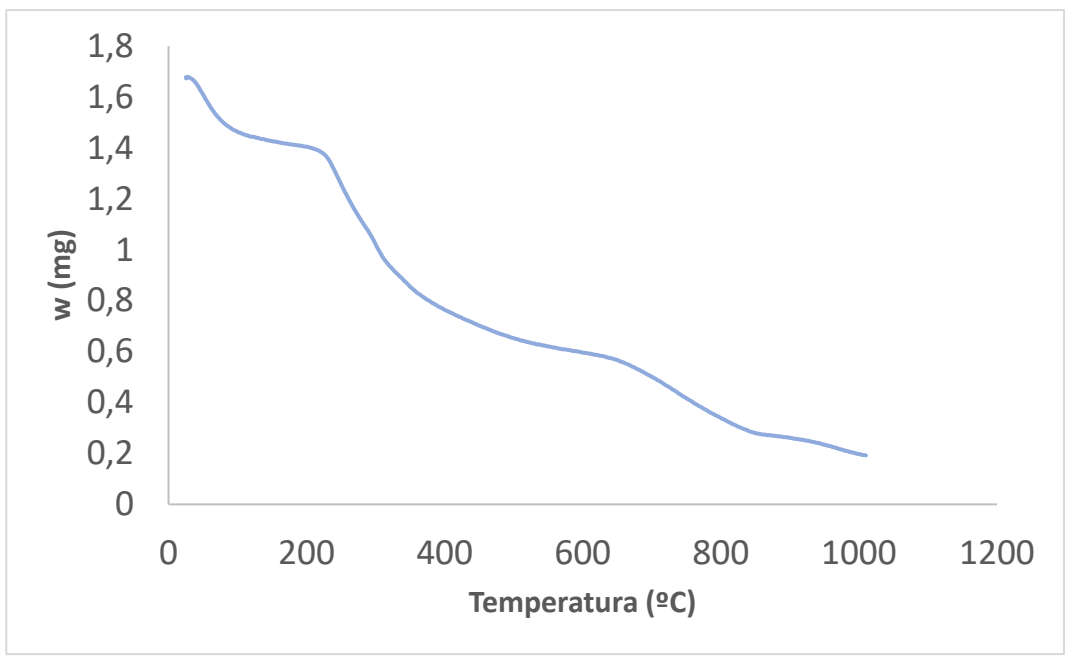
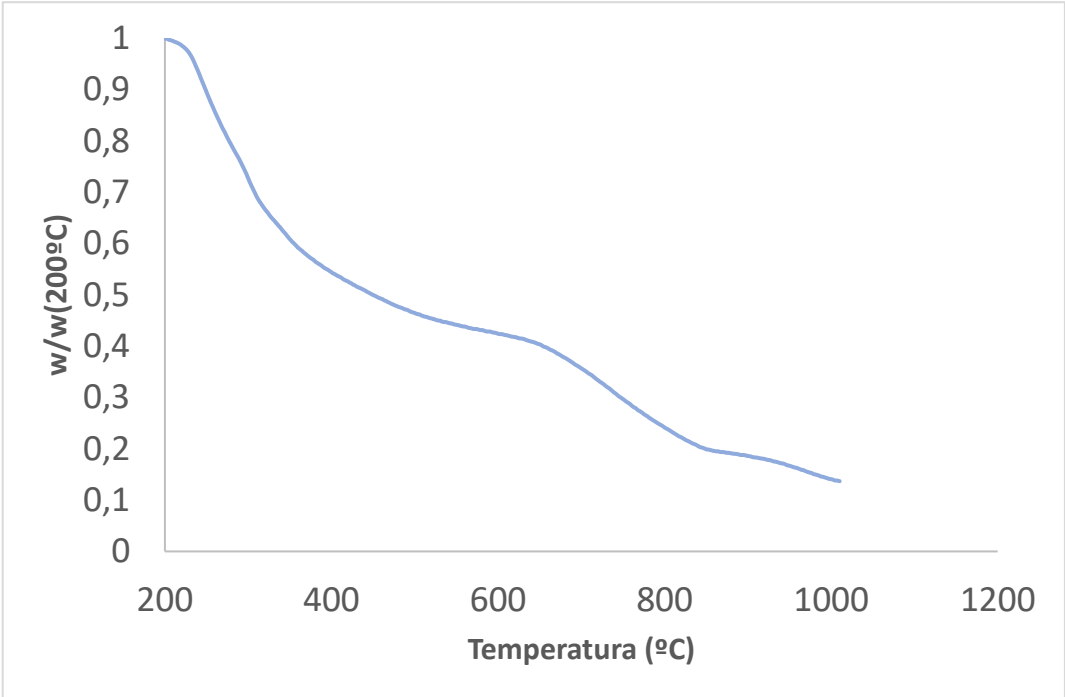
**A****B**

Figura 28. A) Pérdida de peso de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (GA). húmedas en el TGA; B) Evolución de su porcentaje en peso en seco.

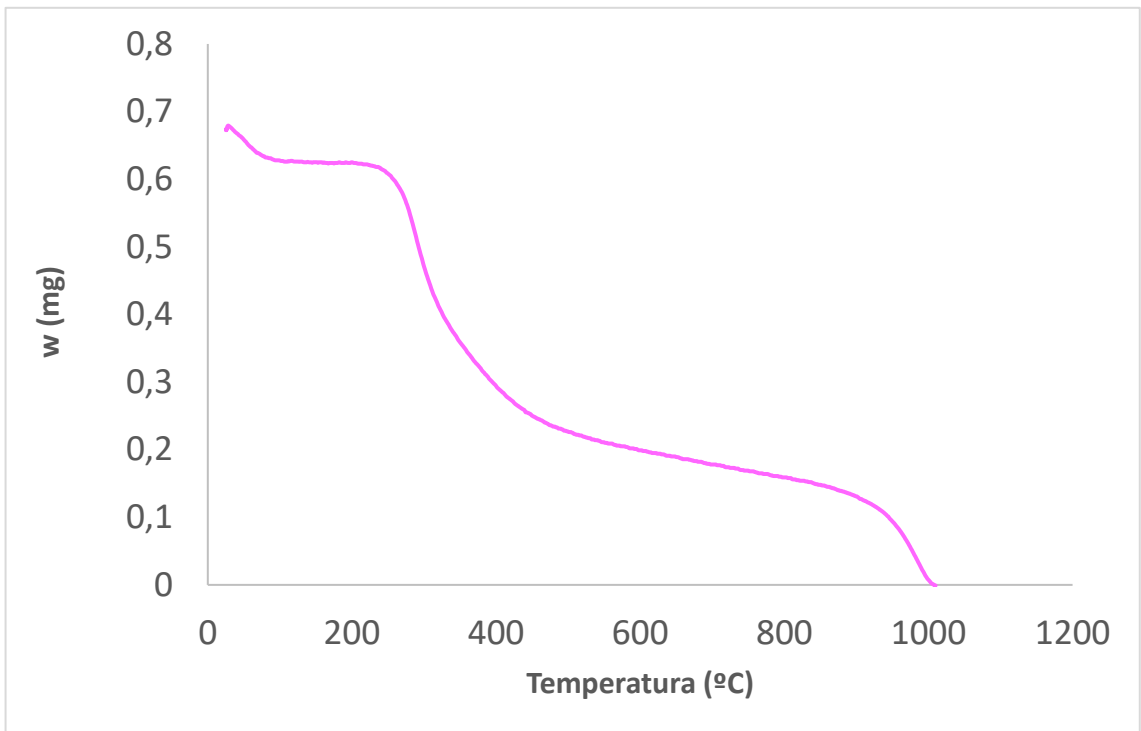
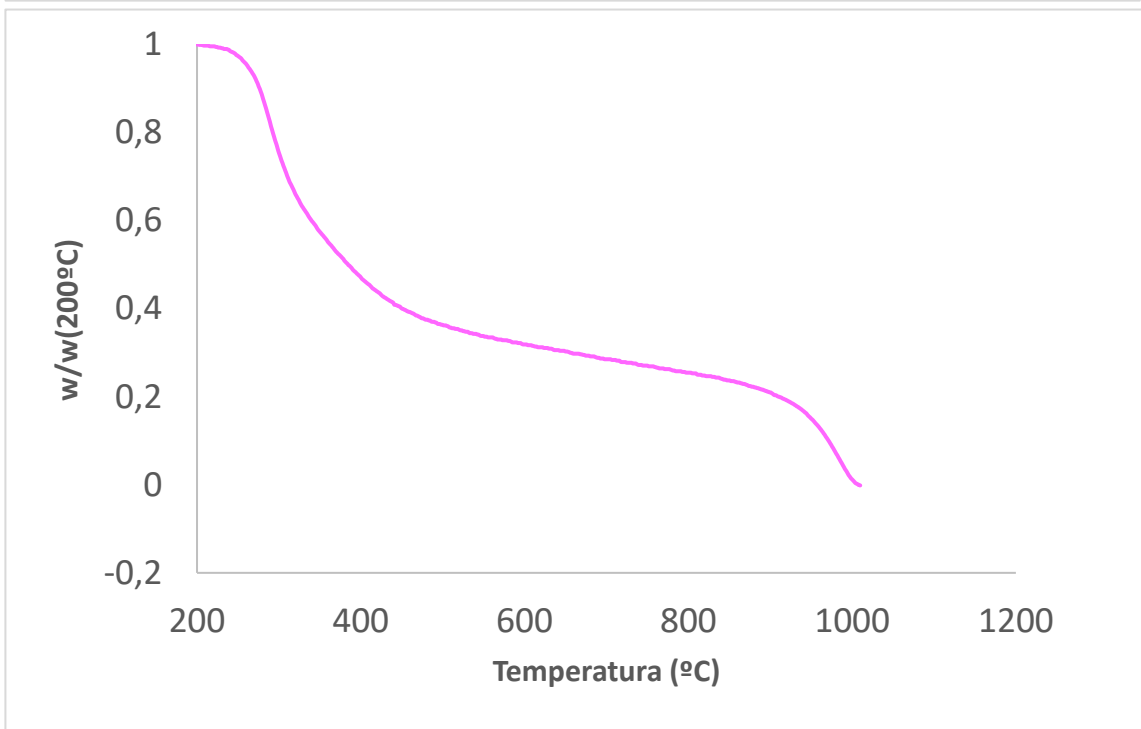
**A****B**

Figura 29. A) Pérdida de peso de la SF pura. B) Evolución de su porcentaje en peso en seco.

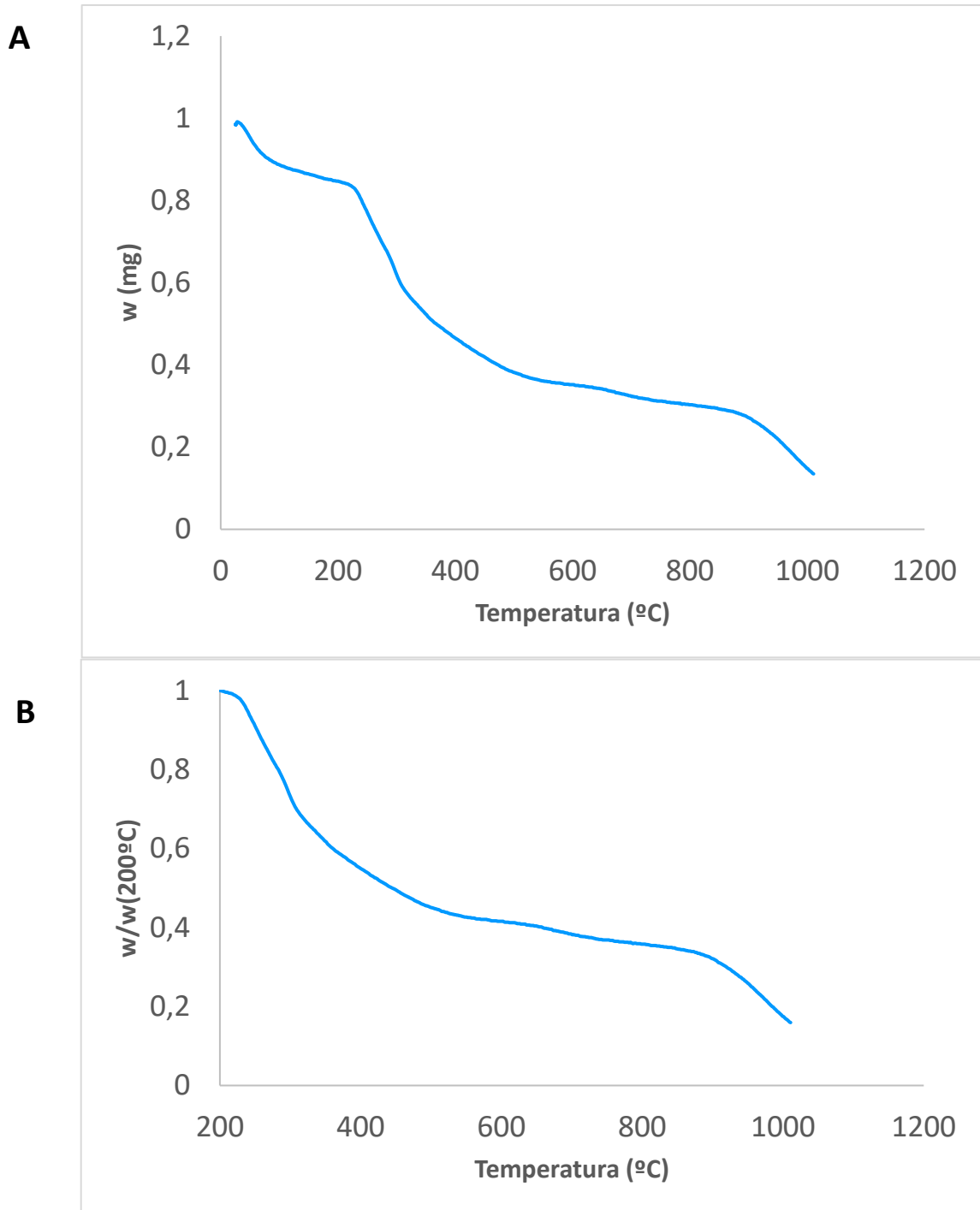


Figura 30. A) Pérdida de peso de las M.ALG-SF húmedas en el TGA. B) Evolución de su porcentaje en peso en seco

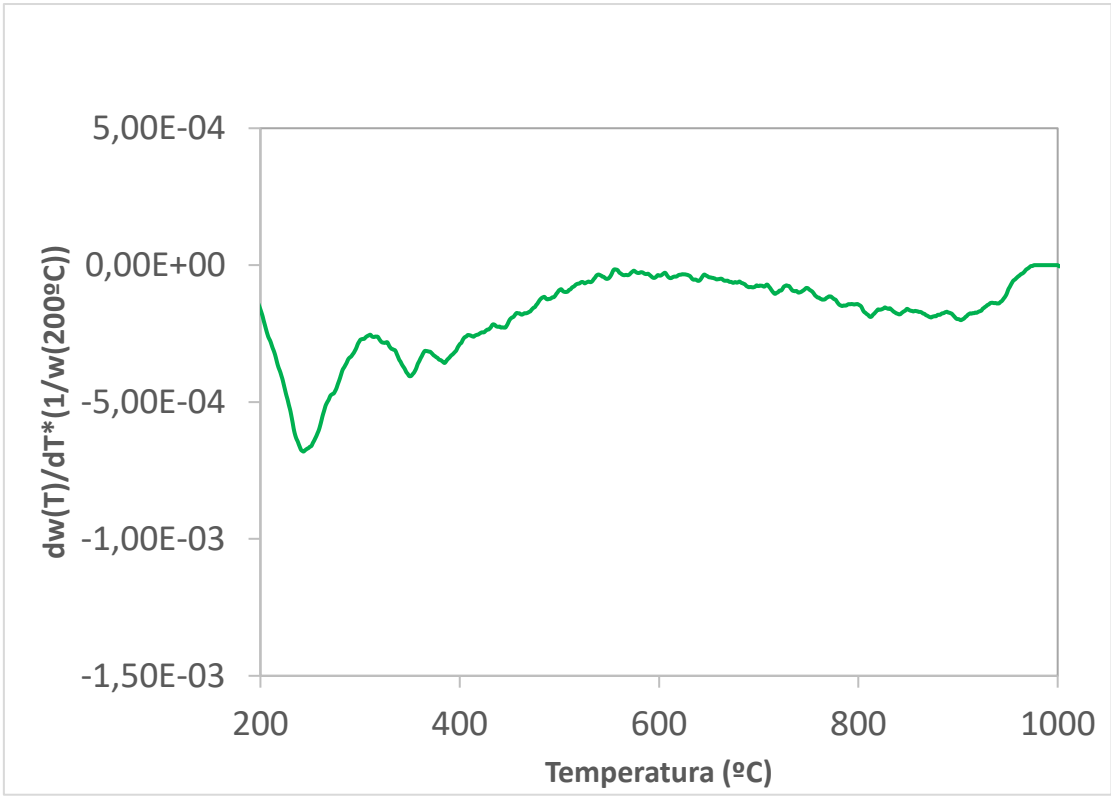


Figura 31. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-GA-SF.

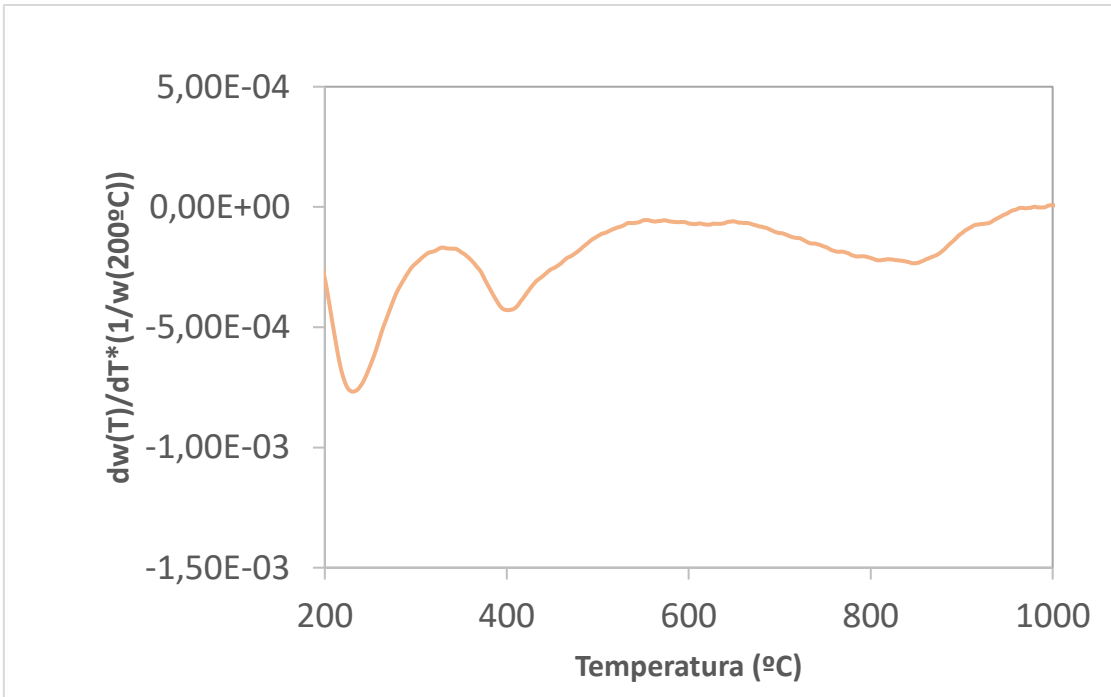


Figura 32. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PREC-SF (EDC/NHS)

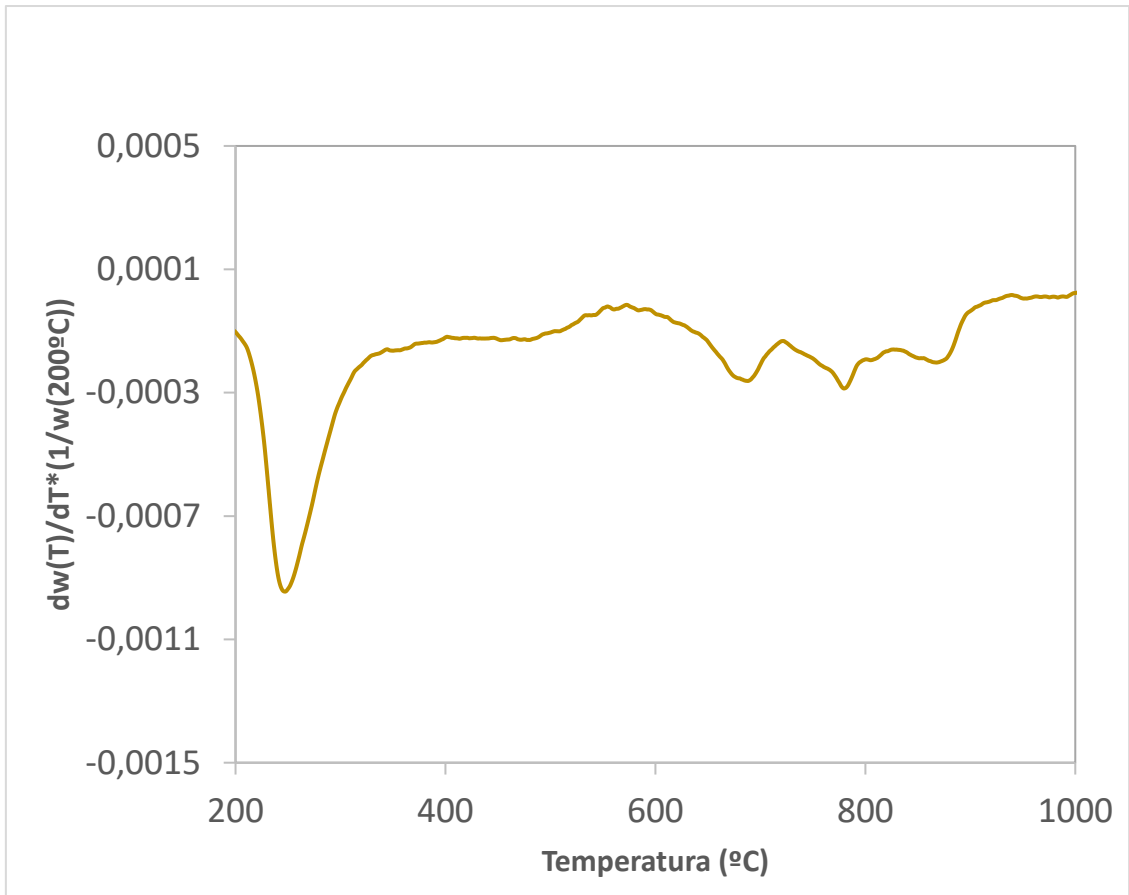


Figura 33. Derivada de la caída del peso en seco de las M.ALG.MAGN.PLL-SF

## 7.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

En la Tabla 4 se representan los resultados del two-way ANOVA con la corrección para comparaciones múltiples empleando el test Turkey's de los datos del ensayo de viabilidad y proliferación celular (MTS).

*Tabla 4. Resultados del análisis estadístico del ensayo MTS. Se muestra el análisis de múltiples comparaciones que indica la significancia estadística entre las muestras.*

<b>Número de familias</b>	<b>1</b>
<b>Número de comparaciones por familia</b>	<b>15</b>
<b>Alpha</b>	<b>0,05</b>

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
DÍA 1:SUSP. vs. DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC.	105139	-26980 to 237259	No	ns	0,1633
DÍA 1:SUSP. vs. DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC-SF	80096	-52023 to 212216	No	ns	0,408
DÍA 1:SUSP. vs. DÍA 3:SUSP.	-76683	-217924 to 64559	No	ns	0,5217
DÍA 1:SUSP. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC.	-85499	-217619 to 46621	No	ns	0,3419
DÍA 1:SUSP. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC-SF	-51538	-183657 to 80582	No	ns	0,803
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC. vs. DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC-SF	-25043	-147362 to 97276	No	ns	0,984
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC. vs. DÍA 3:SUSP.	-181822	-313941 to -49702	Yes	**	0,0046
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC.	-190638	-312957 to -68319	Yes	**	0,0015
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC-SF	-156677	-278996 to -34358	Yes	**	0,0085
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC-SF vs. DÍA 3:SUSP.	-156779	-288898 to -24659	Yes	*	0,0155
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC-SF vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC.	-165595	-287914 to -43276	Yes	**	0,0053
DÍA 1:M.ALG.MAGN.PREC-SF vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC-SF	-131634	-253953 to -9315	Yes	*	0,0312
DÍA 3:SUSP. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC.	-8816	-140936 to 123303	No	ns	>0,9999
DÍA 3:SUSP. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC-SF	25145	-106975 to 157264	No	ns	0,9884
DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC. vs. DÍA 3:M.ALG.MAGN.PREC-SF	33961	-88358 to 156280	No	ns	0,9423