



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Desarrollo de microcápsulas como vehículos de liberación
de componentes bioactivos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Renart Romagosa, Nuria

Tutor/a: Gómez Ribelles, José Luís

Director/a Experimental: García Parra, Nadia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

DESARROLLO DE MICROCÁPSULAS COMO VEHÍCULOS DE LIBERACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2023-2024

AUTORA: NURIA RENART ROMAGOSA

Tutor Académico: Prof. D. José Luis Gómez Ribelles

Cotutora: Dña. Nadia García Parra

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2024

Tipo de licencia: Acceso abierto

Título: Desarrollo de microcápsulas como vehículos de liberación de componentes bioactivos

Resumen

Este trabajo final de grado se enmarca en el proyecto de investigación *Microentorno adaptativo para un modelo de enfermedad in vitro de mieloma múltiple* PID2022-138572OB-C41. El objetivo del proyecto es avanzar en el desarrollo de una plataforma de cultivo de las células del paciente de mieloma múltiple en un entorno realista que simule el microentorno tumoral. En ese sentido, resulta esencial simular la interacción entre las células plasmáticas tumorales y otros tipos celulares del nicho de la médula ósea, en particular, las células madre mesenquimales, MSC. Debido a las dificultades que presenta realizar un co-cultivo in vitro con MSCs y células tumorales de mieloma múltiple a consecuencia de las distintas condiciones requeridas por cada tipo celular, se plantea la alternativa de sustituir las células madre mesenquimales por el secretoma generado por ellas. La estrategia se basa en suministrar el secretoma de MSC en el medio donde se cultivan las células plasmáticas de forma controlada desde un biomaterial. Concretamente en este trabajo se estudiará la formación de microcápsulas con núcleo de alginato y recubrimiento de gelatina A y ácido hialurónico como futuro vehículo de liberación de secretoma de MSC. En este contexto, la liberación de secretoma de MSC desde microcápsulas presenta dos problemáticas que se tratarán de analizar: la carga del secretoma, y el amplio rango de tamaños que abarcan las moléculas que lo conforman. Con respecto a la primera, el secretoma de MSC es un conjunto de moléculas solubles en agua, lo que representa un inconveniente si en el proceso de carga y recubrimiento de las microcápsulas se requiere del uso de soluciones acuosas, puesto que parte del secretoma podría perderse en el proceso. Para encontrar una posible solución, se estudiará un método de carga de moléculas solubles conocido como doble emulsión. Por otro lado, la segunda de las problemáticas que presenta trabajar con el secretoma de MSC, es el gran abanico de tamaños de las moléculas que lo componen. Éstas varían desde proteínas como citocinas o factores de crecimiento hasta vesículas extracelulares o exosomas con pesos moleculares muy variables, lo que puede hacer que se liberen de forma gradual en función de sus tamaños. Esto no resultaría interesante a la hora de suministrar el secretoma en los medios de cultivo, por lo que, siguiendo este enfoque, se buscará desarrollar un sistema de liberación no selectivo por tamaños, de modo que permita liberar la amplitud de moléculas que conforman el secretoma al mismo tiempo y de forma homogénea. Con todo esto, se pretende estudiar este sistema de liberación basado en la síntesis de microcápsulas para el suministro del secretoma de MSCs en nuevas plataformas de cultivo.

Palabras claves: Mieloma múltiple; Células madre mesenquimales; Secretoma; Liberación; Microcápsulas

Autora: Dña. Nuria Renart Romagosa

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2024

Tutor Académico: Prof. D. José Luis Gómez Ribelles

Cotutora: Dña. Nadia García Parra

Tipo de licencia: Acceso abierto

Title: Development of microcapsules as release vehicles for bioactive components

Abstract:

This final degree work is part of the research project Adaptive microenvironment for an in vitro disease model of multiple myeloma PID2022-138572OB-C41. The aim of the project is to advance the development of a platform for culturing multiple myeloma patient cells in a realistic environment that simulates the tumour microenvironment. In this regard, it is essential to simulate the interaction between tumour plasma cells and other cell types in the bone marrow niche, in particular mesenchymal stem cells (MSCs). Due to the difficulties of co-culture in vitro with MSCs and multiple myeloma tumour cells because of the different conditions required by each cell type, the alternative is to substitute mesenchymal stem cells with the secretome generated by them. The strategy is to supply the MSC secretome in the medium where the plasma cells are cultured in a controlled manner from a biomaterial. Specifically, this work will study the formation of microcapsules with an alginate core and gelatin A and hyaluronic acid coating as a future vehicle for MSC secretome release. In this context, the release of MSC secretome from microcapsules presents two problems that will be analysed: the loading of the secretome, and the wide range of sizes of the molecules that comprise it. Regarding the first one, the MSC secretome is a set of water-soluble molecules, which represents a drawback if the loading and coating process of the microcapsules requires the use of aqueous solutions, since part of the secretome could be lost in the process. In order to find a possible solution, a method of loading soluble molecules known as double emulsion will be studied. On the other hand, the second problem of working with the MSC secretome is the wide range of sizes of the molecules that compose it. These range from proteins such as cytokines or growth factors to extracellular vesicles or exosomes with highly variable molecular weights, which can cause them to be released gradually depending on their size. This would not be interesting when supplying the secretome in culture media, so following this approach, the aim is to develop a release system that is not size-selective, so as to release the whole range of molecules that make up the secretome at the same time and in a homogeneous manner. With all this, the aim is to study this release system based on the synthesis of microcapsules for the delivery of the MSCs secretome in new culture platforms.

Key words: Multiple Myeloma; Mesenchymal stem cells; Secretome; Release; Microcapsules

Author: Dña. Nuria Renart Romagosa

Location and date: Valencia, julio de 2024

Academic tutor: Prof. D. José Luis Gómez Ribelles

Cotutor: Dña. Nadia García Parra

Type of licence: Open Access

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo fin de grado en sus instalaciones y por acercarme la realidad del trabajo de investigación en un laboratorio. Gracias también a mis tutores José Luis y Nadia, por acompañarme en el proceso, por sus ideas y sus consejos, dando sentido a todo el trabajo realizado. Gracias a los compañeros y compañeras del CBIT por prestarme su ayuda cuando estaba perdida, y especialmente gracias a Inma, Julia y Ximo por orientarme el camino y arrojar luz cuando la situación se complicaba.

Gracias a Rita, por ser mi pilar fundamental, por las lágrimas compartidas en momentos difíciles, pero, sobre todo, por las risas que han marcado estos 4 años para siempre. Sin ti, jamás hubiera llegado aquí. Gracias a mis amigas, por haber supuesto un apoyo incondicional durante este tiempo, y por demostrarme que, aunque nuestros caminos se separen, sois un lugar seguro donde poder volver. Gracias a todas las nuevas experiencias que he vivido durante la carrera y a todas las personas que he conocido en el camino, por haberme hecho cambiar, aprender y evolucionar.

Por último, gracias a mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano y a mi tía, por ser el mayor apoyo que podría tener, por cuidarme y quererme siempre, y por hacer todo posible para que yo sea feliz. Gracias también a las personas que ya no están, por mandarme fuerza y por enseñarme que la vida, hay que vivirla. Os prometí que estudiaría para poder ayudar a quien lo necesitara, quizás no sea en ciencia, o no en Biotecnología, pero sé que lo conseguiré y que seré feliz en ello.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MIELOMA MÚLTIPLE	1
1.2 MÉDULA ÓSEA. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS TUMORALES	1
1.2.1 La médula ósea	2
1.2.2 Las células madre mesenquimales	2
1.2.3 Interacción entre MSCs y células tumorales	2
1.3 INGENIERÍA TISULAR. TERAPIAS CELULARES Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS	2
1.3.1 Terapias celulares	3
1.3.2 Liberación controlada	3
1.4 NUEVAS PLATAFORMAS DE CULTIVO COMO MODELOS DE ESTUDIO DE MIELOMA MÚLTIPLE	3
1.5 REPRODUCCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DE LA MÉDULA ÓSEA. ENCAPSULACIÓN DEL SECRETOMA DE MSCs	4
1.5.1 Composición del secretoma	4
1.5.2 Encapsulación del secretoma	5
1.6 MICROCÁPSULAS COMO VEHÍCULO DE LIBERACIÓN	5
1.7 MICROESFERAS DE ALGINATO	6
1.7.1 Alginato	6
1.7.2 Microfluídica	7
1.8 CÁPSULAS POR MULTICAPAS DE POLIELECTROLITOS. LAYER BY LAYER (LBL)	7
1.8.1 Gelatina	8
1.8.2 Ácido hialurónico	8
1.9 CARGA DE COMPUESTOS SOLUBLES	9
1.9.1 Doble emulsión	9
1.9.2 Nanopartículas de PLLA	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 REACTIVOS Y EQUIPOS	12
3.2 SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE ALGINATO	13
3.2.1 Preparación de disoluciones	13
3.2.2 Síntesis de microesferas mediante microfluidica	13
3.3 RECUBRIMIENTO DE MICROESFERAS MEDIANTE LBL	14
3.3.1 Preparación de disoluciones	14
3.3.2 Recubrimiento por LBL	15
3.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPÍA ÓPTICA	15
3.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	16
3.5.1 Análisis termogravimétrico (TGA)	16
3.5.2 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	16
3.5.3 BCA	16
3.6 ENSAYO DE ESTABILIDAD	17
3.6.1 Evolución de las microesferas en medios de degradación hidrolítica y enzimática	17
3.6.2 Obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato	17

3.7 DOBLE EMULSIÓN	18
3.7.1 Producción de micropartículas de PLLA. Emulsión O/W	18
3.7.2 Encapsulación de un compuesto soluble. Emulsión W/O	18
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 MICROESFERAS DE ALGINATO. DISPERSIÓN DE TAMAÑOS	20
4.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROESFERAS FUNCIONALIZADAS MEDIANTE LBL DE GeIA/HA	21
4.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	21
4.2.3 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	24
4.2.4 BCA	26
4.3 ENSAYO DE ESTABILIDAD	28
4.3.2 Evolución de las microesferas en medios de degradación hidrolítica y enzimática	28
4.3.3 Obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato	35
4.4 DOBLE EMULSIÓN	36
4.4.2 Partículas de PLLA. Dispersión de tamaños. Emulsión O/W	36
4.4.3 Encapsulación de un compuesto soluble. Emulsión W/O	37
5. CONCLUSIONES	40
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
7. ANEXOS	48
7.1 RESULTADOS DEL TGA SOBRE MICROESFERAS RECUBIERTAS	48
7.2 FOTOGRAFÍAS Y MEDICIONES DEL ENSAYO DE ESTABILIDAD	50

FIGURAS

Figura 1. Representación del microambiente tumoral en la médula ósea (Solimando et al., 2022)

Figura 2. Los cultivos 3D dinámicos ajustan en mayor medida a la realidad existente en el microambiente de la médula ósea (Clara-Trujillo et al., 2022)

Figura 3. Flujos en los dispositivos de microfluídica: unión T (a), co-flow (b) y flow-focusing (c) (Su et al., 2021)

Figura 4. a) Estructura química de la gelatina (Reyes Ortega et al., 2012). b) Estructura química del HA (Marinho et al., 2021)

Figura 5. Representación del proceso de doble emulsión W/O/W (Iqbal et al., 2015)

Figura 6. Montaje empleado para la síntesis de microesferas. Imagen tomada en el laboratorio

Figura 7. Ensayo BCA

Figura 8. Placas p24 del ensayo de estabilidad

Figura 9. Microesferas control de alginato

Figura 10. TGA sobre microesferas control del alginato sin recubrimiento. Curva del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura

Figura 11. TGA en microesferas control del alginato sin recubrimiento. Curva derivada del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura

Figura 12. TGA en microesferas control del alginato sin recubrimiento y microesferas con recubrimiento de 6 bicapas sin entrecruzar. Comparación de la curva derivada del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura

Figura 13. TGA de una muestra seca de penicilina/estreptomicina y fungizona. Curva derivada del peso normalizado por el peso seco respecto a la temperatura

Figura 14. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier de las muestras analizadas

Figura 15. Ampliación entre 1900 y 400 cm^{-1} de los espectros mostrados en la figura anterior

Figura 16. Concentración de gelatina A obtenidas por BCA para cada una de las condiciones de recubrimiento estudiadas

Figura 17. Microesferas de alginato sin recubrimiento en el ensayo de estabilidad

Figura 18. Comparación microesferas a tiempo 0 horas en el ensayo de estabilidad

Figura 19. Comparación microesferas a tiempo 7 horas en el ensayo de estabilidad

Figura 20. Comparación microesferas a tiempo 22 horas en el ensayo de estabilidad

Figura 21. Resultado de la comparación estadística entre microesferas control sin recubrimiento y microesferas con recubrimiento en el ensayo de estabilidad

Figura 22. Microesferas con recubrimiento de 6 bicapas antes y después del tratamiento con EDTA

Figura 23. Micropartículas de PLLA

Figura 24. Resultado fallido del primer intento de emulsión W/O

Figura 25. Resultado fallido del segundo intento de emulsión W/O

Figura 26. Resultado fallido del tercer intento de emulsión W/O

TABLAS

Tabla 1. Diámetro de las microesferas control de alginato

Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar los datos del TGA de todas las muestras estudiadas

Tabla 3. Concentración de gelatina A ($\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenida por ensayo BCA para cada condición de recubrimiento estudiada.

Tabla 4. Comparación de diámetros de las microesferas en el ensayo de estabilidad

Tabla 5. Diámetro de las micropartículas de PLLA

ABREVIATURAS

3L: Microesferas con tres bicpas Gela/HA sin entrecruzar

3T: Microesferas con tres bicpas Gela/HA entrecruzadas

6L: Microesferas con seis bicpas Gela/HA sin entrecruzar

6T: Microesferas con seis bicpas Gela/HA entrecruzadas

Alg: Alginato

BCA: Ácido bicinconínico

C: Microesferas control de alginato sin recubrimiento

DCM: Diclorometano

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

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FTIR: Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

Gela: Gelatina tipo A

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado indeterminado

HA: Ácido hialurónico

LBL: Layer by layer (capa por capa)

MEC: Matriz extracelular

MM: Mieloma múltiple

MNPs: Nanopartículas magnéticas

MSCs: Células madre mesenquimales

NP: Nanopartículas

NSH: N-hidroxisuccinimida

P/S: Penicilina-estreptomina

PCL: Poli-ε-caprolactona

PLA: Ácido poli-láctico

PLGA: Ácido láctico-co-glicólico

PLLA: Ácido poli-L-láctico

PVA: Alcohol polivinílico

TGA: Análisis termogravimétrico

W/O/W: Doble emulsión agua/aceite/agua

W/O: Emulsión simple agua/aceite

ALINEACIÓN CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

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

Este trabajo fin de grado puede relacionarse de forma directa con dos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible adoptados por las Naciones Unidas para su cumplimiento en 2030.

En primer lugar, con el ODS 3: Salud y bienestar. El proyecto en el que se engloba este trabajo aspira al desarrollo de nuevas plataformas de cultivo in vitro para profundizar en el estudio del mieloma múltiple, la segunda neoplasia hematológica más frecuente en el mundo. Las nuevas plataformas de cultivo deben recrear el microentorno tumoral de la enfermedad generando así un modelo de enfermedad realista para futuros estudios. Por ello en este trabajo se busca en el desarrollo de microcápsulas de gelatina y ácido hialurónico como sistemas de liberación compuestos bioactivos que permitan reproducir fielmente el ambiente extracelular de la enfermedad en las plataformas de cultivo empleadas. Esta estrategia de mejora de los modelos de enfermedad in vitro permitirá estudiar y conocer en profundidad los mecanismos biológicos y moleculares adyacentes al mieloma múltiple. Un mayor conocimiento de la enfermedad permite, entre otras cosas, un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia a fármacos que desarrollan con frecuencia las células tumorales, y superarlos conllevará el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más eficientes. Además, disponer de modelos de enfermedad más realistas permitirá una mejor evaluación de la eficacia de los nuevos tratamientos al ensayarlos en un entorno similar a la realidad, aumentando así la probabilidad de éxito y acelerando el desarrollo de terapias más efectivas, eficientes y personalizadas.

El segundo ODS con el que se relaciona este trabajo es el ODS 9: Industria, innovación e infraestructura. En este contexto, el objetivo final de esta investigación espera favorecer el avance en el conocimiento del mieloma múltiple como consecuencia del desarrollo de un modelo de estudio de esta enfermedad innovador y novedoso. En particular, podría considerarse una estrategia innovadora en el campo de la ingeniería de tejidos y la biomedicina, aportando un nuevo enfoque que puede ser aplicado en otros tipos de cáncer y enfermedades.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad neoplásica caracterizada por la proliferación descontrolada de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea, y la acumulación excesiva de una inmunoglobulina anormal (proteína monoclonal o proteína M) (Gerecke et al., 2016).

El MM surge de una condición asintomática premaligna, la gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), que puede permanecer estancada o progresar hacia MM latente y MM activo. Se desconoce qué determina si una célula premaligna se transformará, pero anomalías genéticas están asociadas al desarrollo de la enfermedad y presentes en la mayoría de los pacientes (Bernstein et al., 2022) (C J van de Donk et al., 2021). La interacción entre las células tumorales y el microambiente que las rodea favorece también la transformación y proliferación de células plasmáticas tumorales (Marín-Payá et al., 2021).

El mieloma múltiple representa el 1% de todos los cánceres del mundo y 12% de todas las neoplasias malignas hematológicas, con alrededor de 35.000 nuevos casos y 12.000 muertes al año (Callander et al., 2022).

El daño tisular asociado a esta enfermedad da lugar a hipercalcemia, disfunción renal, anemia, inmunodeficiencia y deterioro óseo (Rodríguez-Otero et al., 2021). Las opciones de tratamiento actuales permiten alargar la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, la enfermedad sigue siendo incurable, y supone un enorme impacto para el paciente condicionando su calidad de vida de forma permanente (Bernstein et al., 2022).

1.2 Médula ósea. Células madre mesenquimales y su interacción con células tumorales.

En relación al estudio del cáncer, se consideraba que la transición celular hacia un estado tumoral dependía exclusivamente de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas. En la actualidad se conoce que la interacción entre las células tumorales y el entorno que las rodea es clave en la transformación maligna. Las neoplasias malignas hematológicas se desarrollan en la médula ósea. Por ello, la patogénesis y progresión de la enfermedad están drásticamente afectadas por el microambiente tumoral de dicho tejido (García-Ortiz et al., 2021), un agente fundamental para la transformación, supervivencia, resistencia y recurrencia de las células plasmáticas tumorales.

El estudio del microambiente tumoral y las interacciones entre sus componentes es esencial para recrear el entorno en el que se desarrolla el cáncer, replicar su comportamiento in vitro y avanzar en su estudio.

1.2.1 La médula ósea

La médula ósea es un tejido heterogéneo y complejo donde se diferencian componentes celulares y no celulares. Entre los componentes no celulares se incluyen de factores solubles (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) y elementos de la matriz extracelular (MEC), como laminina, colágeno, fibronectina, proteoglicanos, heparán sulfato y ácido hialurónico (Marín-Payá et al., 2021). Entre los componentes celulares, se diferencian células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos), células inmunes (macrófagos, células natural killer, linfocitos T y B, y células T reguladoras), adipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas (Clara-Trujillo et al., 2022).

Las células tumorales de mieloma múltiple interactúan con todos los elementos presentes lo que conlleva una remodelación del nicho medular, influenciada por mecanismos de hipoxia, angiogénesis, inflamación y reprogramación metabólica (Clara-Trujillo et al., 2020) [Figura 1]. Como consecuencia, se genera un microambiente tumoral óptimo para el desarrollo de la

enfermedad que facilita la evasión inmune, activa de rutas de supervivencia, genera mecanismos de defensa frente a especies reactivas y desarrolla vías de resistencia a fármacos y quimioterapias (Méndez-Ferrer et al., 2020). Se puede concluir así que el microambiente tumoral de la médula ósea es esencial en la progresión del mieloma múltiple. Por ello, el estudio de ciertos de sus componentes podría servir como biomarcador de pacientes susceptibles de presentar la enfermedad (Sklavenitis-Pistofidis et al., 2019).

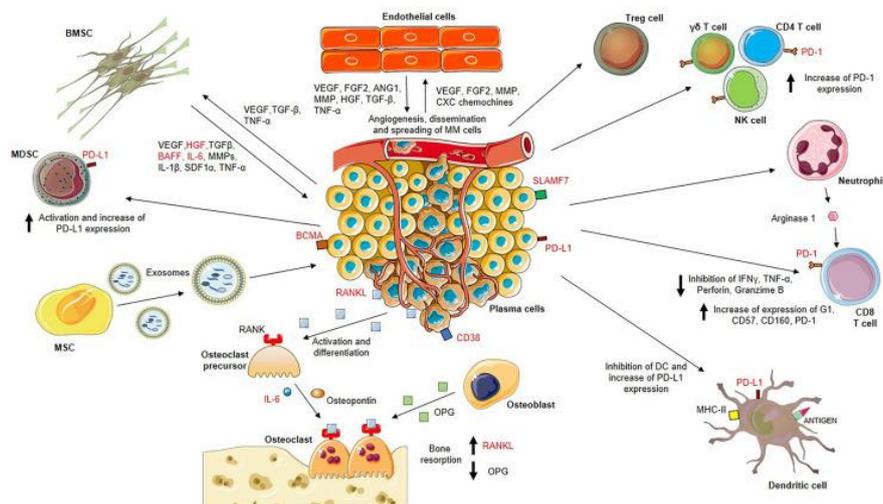


Figura 1. Representación del microambiente tumoral en la médula ósea (Solimando et al., 2022).

1.2.2 Las células madre mesenquimales

Uno de los componentes fundamentales del nicho de la médula ósea son las células madre mesenquimales (MSCs), que se caracterizan por: capacidad de diferenciación en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Lin et al., 2019), adherencia en cultivo, expresión positiva de CD73, CD90 y CD105, y ausencia de expresión de CD14, CD19, CD34, CD45 y antígeno leucocitario humano (HLA)-DR. (Arthur & Gronthos, 2020).

Las MSCs son muy poco abundantes en la médula ósea (menos del 0,01% del total de células mononucleadas) (García-Gomez, 2014). Sin embargo, desempeñan un papel fundamental por su interacción con múltiples células, entre ellas las células plasmáticas de MM.

1.2.3 Interacción entre MSCs y células tumorales

La interacción entre las células de mieloma múltiple y las células madre mesenquimales es bidireccional. Las células tumorales alteran el comportamiento de las MSCs aumentando la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, el deterioro óseo, la producción de citoquinas y la senescencia temprana (García-Gomez, 2014). Como consecuencia, las MSCs de afectadas presentan un potencial osteogénico reducido, marcadores de superficie anormales y una función secretora alterada asociada a un aumento del nivel citoquinas proinflamatorias que promueve las lesiones óseas y un microambiente protumoral óptimo para la progresión del cáncer. La interacción entre ambos tipos celulares está mediada por comunicación directa y por la secreción de factores solubles y vesículas extracelulares (García-Sánchez et al., 2023).

1.3 Ingeniería tisular. Terapias celulares y liberación controlada de fármacos.

La ingeniería de tejidos emplea elementos de la biología, la ciencia de materiales, la medicina y la ingeniería. Mediante la combinación de biomateriales o andamios estructurales, células y moléculas bioactivas se obtienen soportes similares al tejido humano, que son implantados en el huésped para restaurar la función del tejido u órgano dañado (E. J. Lee et al., 2014).

Los biomateriales contienen y transportan células y moléculas esenciales en la regeneración de tejidos, puesto que se induce su diferenciación hacia el fenotipo deseado mediante estímulos biofísicos y bioquímicos. Sin embargo, también resulta interesante el uso de biomateriales como vehículos de transporte y liberación controlada de factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios o moléculas farmacológicas.

1.3.1 Terapias celulares

La ingeniería tisular desarrolla plataformas de estructura similar a la matriz extracelular que permiten la encapsulación y expansión in vitro de muchos tipos celulares. Como ejemplo, biomateriales embebidos con células madre mesenquimales MSCs para la regeneración del músculo cardíaco tras un infarto de miocardio, o para la regeneración ósea tras infecciones o traumatismos graves (Ji et al., 2020). También células pancreáticas, hepatocitos o células endoteliales han sido encapsuladas y crecidas en biomateriales manteniendo sus características. Entre los inconvenientes de esta estrategia, destaca que las células cargadas en el biomaterial pueden no adaptarse correctamente al tejido de destino no anclándose y no llevando a cabo su función.

Sin embargo, el implante de un biomaterial no siempre tiene como objetivo el aporte de nuevas células funcionales, sino que el propio biomaterial actúa como factoría de liberación de moléculas y factores que inducen la regeneración de tejidos (Cao et al., 2021).

1.3.2 Liberación controlada

La carga de biomateriales con moléculas bioactivas genera un sistema de liberación controlada de las mismas que permite la dirección a una localización concreta, la prolongación de su vida útil y la reducción de su toxicidad (Wang et al., 2020). Las moléculas bioactivas se liberan por difusión desde el biomaterial o se anclan al él con determinados enlaces de degradación regulada. Uno de los biomateriales más utilizados como sistema de liberación controlada son las partículas de tamaño micrométrico o nanométrico.

Una liberación controlada hace referencia al diseño de un material que permita controlar el momento y lugar inicial de liberación, y la velocidad del proceso. Los biomateriales como plataformas de liberación cumplen estos objetivos por sus propiedades físicas ajustables, su biodegradabilidad controlable y las interacciones fisicoquímicas existentes con los compuestos encapsulados (J. Li & Mooney, 2016).

1.4 Nuevas plataformas de cultivo como modelos de estudio de mieloma múltiple.

El desarrollo de biomateriales combinados con células y compuestos activos imitando la arquitectura tisular puede emplearse en la generación de plataformas de cultivo in vitro que reproduzcan fielmente el entorno tisular obteniendo modelos de estudio de enfermedades más cercanos a la realidad. En el caso del MM es necesario recrear el microambiente tumoral de la médula ósea puesto que juega un papel decisivo en el desarrollo de la enfermedad. No obstante, su complejidad estructural dificulta la simulación este entorno tisular in vitro.

Pese a ello, se ha desarrollado una plataforma de cultivo tridimensional que reproduce el entorno medular y permite vencer las limitaciones asociadas a modelos animales y cultivos 2D. Los modelos animales no permiten recrear procesos patológicos complejos y presentan diferencias genéticas, moleculares e inmunológicas respecto a humanos. Por su parte, los cultivos en 2D no permiten recrear la tridimensionalidad de un microambiente tumoral (Clara-Trujillo et al., 2020). Los modelos de estudio basados en hidrogeles superan las barreras mencionadas acercándose a la realidad, pero presentan una limitación en cuanto al confinamiento celular y su perfil estático. El microentorno de la médula ósea es semisólido, dinámico y con una elevada movilidad celular, por ellos se ha avanzado hacia plataformas de

cultivo tridimensionales basadas en suspensiones dinámicas de microesferas y células tumorales de MM. Es lo que se conoce como microgel [Figura 2]. El uso de microesferas como base de esta plataforma permite funcionalizarlas por recubrimientos con moléculas características de la matriz extracelular de la médula ósea aumentando la similitud entre los soportes de cultivo y el entorno donde se desarrolla la enfermedad (Clara-Trujillo et al., 2022). Así mismo, la utilización de microesferas presenta grandes posibilidades como sistema para la encapsulación y posterior liberación de fármacos o moléculas bioactivas de interés (García-Briega et al., 2022).

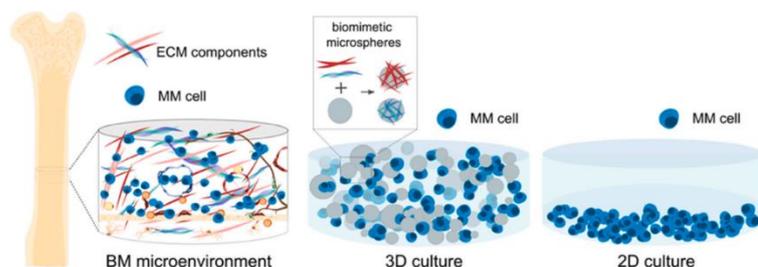


Figura 2. Los cultivos 3D dinámicos ajustan en mayor medida a la realidad existente en el microambiente de la médula ósea (Clara-Trujillo et al., 2022).

1.5 Reproducción del microambiente tumoral de la médula ósea. Encapsulación del secretoma de MSCs

La interacción entre las células tumorales y el microambiente que las rodea es clave en todos los tipos de cáncer. En el caso del mieloma múltiple presenta especial importancia la interacción entre células madre mesenquimales de la médula ósea y células plasmáticas tumorales. Para reproducir el microambiente tumoral de la médula ósea en plataformas de cultivo, es necesario incorporar componentes de la matriz extracelular y células circundantes (MSCs) para recrear las interacciones de las células tumorales con todos los componentes.

El desarrollo de nuevos soportes para el cocultivo de MSCs y células tumorales de MM presenta dificultades por los distintos requerimientos de cada tipo celular. Por ello, se plantea sustituir el uso de células madre mesenquimales por la liberación controlada su secretoma, un conjunto de biomoléculas solubles y vesículas extracelulares producido por las MSCs para su interacción con otras células del nicho medular, entre ellas, las células tumorales de MM. Con este fin se generará un biomaterial de encapsulación del secretoma para su liberación en plataformas de cultivo, replicando indirectamente la interacción entre MSCs y células MM.

El uso del secretoma presenta ventajas frente al cocultivo celular; es de fácil producción, manipulación y almacenamiento, conlleva una menor inmunogenicidad y un menor riesgo de efectos secundarios derivados del uso directo de células y evita problemas de supervivencia de las MSCs en soportes de cultivo y de reducción de su eficacia terapéutica (González-González et al., 2020). Estas ventajas permiten considerar que incorporación del secretoma de MSCs, en sustitución de las propias células, en las nuevas plataformas de cultivo será un gran avance para el estudio in vitro del mieloma múltiple.

1.5.1 Composición del secretoma

El secretoma producido por las células madre mesenquimales contiene biomoléculas solubles y vesículas extracelulares de diversos tamaños. Tras la interacción de las MSCs con las células tumorales, su secretoma varía favoreciendo un microambiente tumoral óptimo para el desarrollo de la enfermedad (Zimmerlin et al., 2013) (Ascencio González & Ochoa Carrillo, 2016).

Los factores solubles que componen el secretoma son citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que actúan sobre células tumorales, células endoteliales, fibroblastos y células inmunes en diversos procesos neoplásicos. Estos factores exhiben efectos angiogénicos, antiapoptóticos e inmunomoduladores proinflamatorios (Arifka et al., 2022), generando un microambiente protumoral.

En relación a las vesículas extracelulares del secretoma, pueden ser de tamaño nanométrico o micrométrico, y se diferencian en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (González-González et al., 2020). Los exosomas son los de mayor importancia ya que contienen biomoléculas proinflamatorias, prometastáticas y antiapoptóticas que promueve la progresión de la enfermedad (García-Sánchez et al., 2023).

Debido a la amplia variedad tamaños de las moléculas que componen el secretoma de las MSCs, resulta difícil encapsularlas en un biomaterial que permita una liberación controlada de las mismas (como sustitución del uso de MSCs). La dificultad reside en lograr una liberación controlada, homogénea y simultánea de todas las moléculas constituyentes del secretoma, independientemente de su tamaño. No resulta conveniente un sistema de liberación basado en difusión, sino que el biomaterial cargado deberá romperse de forma íntegra para permitir una liberación simultánea de todos los compuestos encapsulados.

1.5.2 Encapsulación del secretoma

Se han desarrollado varios sistemas de administración de secretoma de MSCs que permiten un mejor control del proceso de liberación. Entre ellos destacan la inyección directa, la inyección sistémica o su liberación desde un hidrogel (Arifka et al., 2022). Varios estudios anteriores han logrado encapsular el secretoma en hidrogeles poliméricos, aumentando su bioactividad y su potencial terapéutico, y permitiendo una liberación controlada y sostenida.

Liu et al. emplearon un hidrogel reticulado de ácido hialurónico para la encapsulación y liberación sostenida secretoma en la reparación del daño endometrial (F. Liu et al., 2019). Por su parte Liguori et al. regeneraron tejido cardíaco tras encapsular el secretoma en hidrogeles basados en matriz extracelular cardíaca descelularizada (Liguori et al., 2021). Sin embargo, el uso de hidrogeles cargados de secretoma es especialmente útil en la regeneración de lesiones cutáneas. Sears et al. desarrollaron hidrogeles híbridos de metacrilato de gelatina y diacrilato de polietilenglicol cargados con secretoma que permitieron una mejor regeneración del tejido y cicatrización de heridas (Sears et al., 2021), al igual que el hidrogel de colágeno cargado con secretoma desarrollado por Kraskiewicz et al (Klimczak et al., 2021).

1.6 **Microcápsulas como vehículo de liberación**

Como sistemas de liberación controlada del secretoma de MSCs, tiene un gran interés el uso de microcápsulas huecas basadas en hidrogeles poliméricos como biomateriales de transporte y liberación de compuestos bioactivos. Las microcápsulas de tamaño micrométrico han sido ampliamente utilizadas en estudios de encapsulación y liberación controlada de biomoléculas de interés, ya que en función del material de las cápsulas puede regularse el tiempo de degradación de las mismas, la velocidad de liberación de su contenido y la dosis liberada, parámetros esenciales para la optimización de este tipo de procesos.

Las microcápsulas basadas en biomateriales suponen una mejora con respecto a los sistemas tradicionales de administración de fármacos u otros compuestos de interés ya que permiten una liberación controlada, sostenible y localizada, un aumento de la vida útil y estabilidad del compuesto encapsulado y una reducción de su toxicidad (Wani et al., 2023).

En cuanto a estudios anteriores basados en el desarrollo de microcápsulas para la liberación de moléculas bioactivas, cabe destacar la gran variedad de compuestos encapsulados mediante esta técnica. Kim et al. demostraron que la administración de amiodarona, fármaco frente arritmias cardíacas, mediante microcápsulas de polielectrolitos permitía una reducción de su toxicidad y acumulación inespecífica, y por tanto, una mejora en el tratamiento (Kim et al., 2023). Deng et al. comprobaron que encapsular la β -galactosidasa en microcápsulas de esporopolenina permitía un aumento de su estabilidad y la vida útil al retrasar su degradación en el tracto gastrointestinal

(Deng et al., 2020). Asimismo, Lui et al. desarrollaron un sistema de administración de levotiroxina, fármaco frente al hipotiroidismo, basado en microcápsulas blandas de gelatina, que mostró un perfil de liberación sostenido reduciendo los problemas por malabsorción del medicamento (Liu et al., 2023). Kumar et al. encapsularon α -CGRP, un neuropéptido cardioprotector, en microcápsulas de alginato mejorando su biodisponibilidad y la duración de su efecto terapéutico (Kumar et al., 2021). De forma similar Ma et al. desarrollaron microcápsulas de clorhidrato de pramipexol aumentando la vida útil de este compuesto en el tratamiento frente al Parkinson (Ma et al., 2023). Este sistema no es solo utilizado para la encapsulación de fármacos, por ejemplo, Yang et al. encapsularon ácido indol-3-propiónico, un importante metabolito, en microcápsulas de alginato y almidón recubiertas de quitosano permitiendo la modulación de la microbiota intestinal, clave en múltiples enfermedades (Yang et al., 2022). Por otro lado, Luo et al. fueron capaces de encapsular células β productoras de insulina completas en microcápsulas porosas de alginato y celulosa, mejorando así los niveles glucosa en sangre en pacientes con diabetes (Luo et al., 2023).

La liberación de biomoléculas contenidas en las microcápsulas por difusión depende de su tamaño. El secretoma de las MSCs contiene moléculas de tamaños muy diversos, por lo que se requiere para su liberación un sistema no selectivo por tamaños que permite una salida homogénea y simultánea de todos los componentes. Esto se traduce en una ruptura completa de las microcápsulas asegurando una liberación total de su contenido.

En este trabajo, el objetivo es el desarrollo de microcápsulas de gelatina y ácido hialurónico por recubrimiento de microesferas de hidrogel de alginato, y su evaluación como vehículo de liberación para posteriores estudios de encapsulación y suministro de secretoma. El recubrimiento de microesferas por capas de polielectrolitos permitirá contener y regular la difusión de la carga previamente introducida en la microesfera de hidrogel.

1.7 Microesferas de alginato

La síntesis de microcápsulas huecas requiere de una base de microesferas hidrogel de alginato que serán posteriormente recubiertas.

1.7.1 Alginato

El alginato (Alg) es un polisacárido presente en las paredes celulares de algas marinas pardas. Está formado por dos monómeros: ácido 1,4- β -D-manurónico y ácido 1,4- α -L-gulurónico, que se organizan en bloque o de forma alterna para formar cadenas poliméricas aniónicas. Es un biomaterial es frecuentemente utilizado para aplicaciones biomédicas por su alta biocompatibilidad, baja citotoxicidad y coste asequible. Presenta una biodegradación lenta, incompleta e incontrolable, limitación superada por su susceptibilidad a la reticulación y a la modificación de su superficie (Rastogi & Kandasubramanian, 2019).

El alginato es especialmente adecuado para la encapsulación compuestos bioactivos debido a su rápida reticulación iónica en presencia de cationes divalentes de calcio formando hidrogeles. Los ácidos carboxílicos del alginato se unen cooperativamente a un catión calcio y generando puntos de entrecruzamiento entre las cadenas de alginato que dan lugar a un hidrogel reversible (García-Briega et al., 2022), estable, biocompatible y biodegradable.

1.7.2 Microfluídica

Las microesferas de alginato se obtienen mediante sistemas de microfluídica que permiten la obtención de microesferas uniformes con un rango de tamaño controlado (Caballero Aguilar et al., 2021).

En un dispositivo de microfluídica las partículas se forman por las fuerzas de corte que se producen en la intersección entre un microcanal por el que circula un fluido que actúa como fase continua (en nuestro caso un aceite vegetal) y el canal por el que circula la fase acuosa. La relación de caudales entre un flujo y otro, sus viscosidades, temperatura y otros parámetros determina el tamaño de las microgotas formadas (Su et al., 2021). Ambas fases son inmiscibles de modo que se generan microesferas por microemulsiones dentro del sistema.

Los dispositivos de microfluídica pueden trabajar en unión T, en co-flow y o en flow-focusing [Figura 3]. En este caso se utilizará un sistema flow-focusing, donde la fase continua corta en perpendicular a la fase discontinua formando las microgotas deseadas, que serán posteriormente coaguladas para formar microesferas sólidas (Singhal & Gupta, 2016). En este caso la coagulación se llevará a cabo mediante el uso de un agente entrecruzador. El material del sistema debe ser afín al medio continuo en cuanto a su hidrofiliicidad o hidrofobicidad, y contrario al medio discontinuo, asegurando que la microgota se repele y no se deshace por contacto (Nisisako et al., 2005).

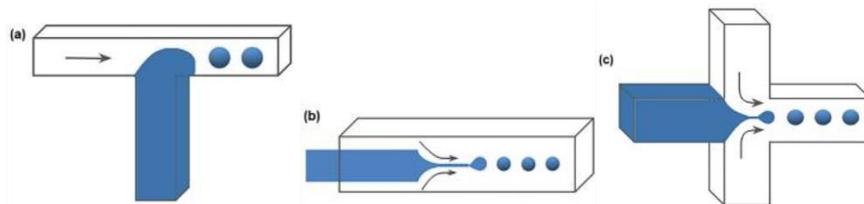


Figura 3. Flujos en los dispositivos de microfluídica: unión T (a), co-flow (b) y flow-focusing (c) (Su et al., 2021).

1.8 Cápsulas por multicapas de polielectrolitos. Layer by layer (LBL)

Una de las estrategias más utilizadas para la obtención de microcápsulas es el recubrimiento del biomaterial de partida mediante multicapas alternas de polielectrolitos de carga opuesta. Esta técnica se conoce como recubrimiento capa por capa (layer by layer, LBL). En este caso el biomaterial de partida son las de microesferas alginato, cuya superficie presenta carga negativa facilitando la deposición de una primera capa polication. Esta primera capa no solo neutraliza las cargas negativas de la superficie, sino que deja una carga positiva expuesta, permitiendo la deposición de una capa de un polianión sobre ella y así sucesivamente. Por tanto, el establecimiento de las capas se basa en la interacción electrostática entre las moléculas empleadas, lo que permite una versatilidad enorme en cuanto a las moléculas que pueden aplicarse (Marín-Payá et al., 2022).

El recubrimiento mediante LBL cumple varios objetivos: estabilización de las microesferas, funcionalización con biomoléculas características de la matriz extracelular del tejido deseado para su uso en plataformas de cultivo, y posibilidad de licuar su núcleo interior para formar microcápsulas huecas susceptibles de ser cargadas y actuar como vehículos de liberación (García-Briega et al., 2022).

Estudios anteriores han demostrado el aumento de estabilidad de microesferas de alginato recubiertas mediante LBL polielectrolitos quitosano/heparina, polilisina/alginato (García-Briega et al., 2022) y colágeno/ácido hialurónico (Marín-Payá et al., 2021). Asimismo, Grech et al.

demonstraron un aumento en la estabilidad mecánica de las microesferas de quitosano tras un LBL ácido hialurónico/quitosano (Grech et al., 2010). Del mismo modo Linn et al. también demostraron un aumento de la estabilidad de las microesferas de sílice al ser funcionalizadas con quitosano/ácido poliláctico (Lin et al., 2023). Meng et al. por su parte estabilizaron las gotas de una emulsión aceite-agua por LBL quitosano/polifenoles (Meng et al., 2023).

En este trabajo se ha realizado el recubrimiento de microesferas mediante LBL gelatina A /ácido hialurónico, recubrimiento utilizado con éxito en estudios anteriores. Li et al. modificaron injertos de tereftalato de polietileno mediante este LBL, y su cocultivo con fibroblastos dio lugar a una mayor regeneración de tejido entre las fibras injertadas (H. Li et al., 2012). Ge et al. encapsularon células madre neurales empleando este LBL para su injerto en trasplantes cerebrovasculares. Tras ser implantadas, aumentaron su supervivencia y diferenciación, mejorando la recuperación funcional del tejido cerebral (Ge et al., 2022).

1.8.1 Gelatina

La gelatina (Gela) es un polímero proteico obtenido de la degradación parcial del colágeno, el principal componente proteico de la matriz extracelular de tejidos conectivos [Figura 4a)] (Reyes Ortega et al., 2012). La gelatina presenta carga positiva, por lo que puede ser utilizada como poliación en los procesos de LBL. La gelatina es un material biomimético, biocompatibles y biodegradable, con bajos niveles de inmunogenicidad y citotoxicidad. Puede ser modificada a nivel de aminoácidos para reaccionar con otras sustancias o variar sus cargas electrostáticas. Es frecuentemente empleada en ingeniería tisular como biomaterial para modelos de enfermedades del sistema nervioso (Ge et al., 2022), como en terapias de suministro controlado de fármacos (Mushtaq et al., 2022).

1.8.2 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un heteropolisacárido perteneciente al grupo de los glicosaminoglicanos. El HA está formado por cadenas de disacáridos alternos: ácido D-glucurónico y N -acetil-D-glucosamina [Figura 4b)]. Al igual que el colágeno, es una de las moléculas más abundantes en la matriz extracelular de tejidos conectivos, donde actúa hidratándola, y regulando la homeostasis y la resistencia a las fuerzas de compresión (Abatangelo et al., 2020). El HA presenta carga negativa, por lo que puede ser utilizado como polianión en los procesos de LBL. El HA es un material biocompatible, biodegradable, no tóxico y no inmunogénico. Por ello es utilizado en ingeniería tisular para sistemas de administración de fármacos, fabricación de hidrogeles y soportes 3D, medicina regenerativa, ect (Saravanakumar et al., 2022).

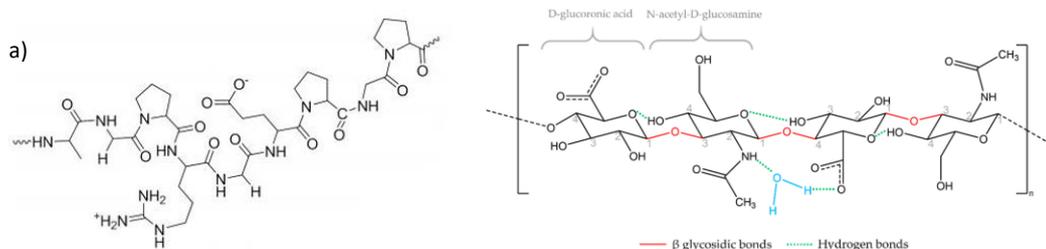


Figura 4. a) Estructura química de la gelatina (Reyes Ortega et al., 2012). b) Estructura química del HA (Marinho et al., 2021).

1.9 Carga de compuestos solubles

El diseño de sistemas de liberación por encapsulación de compuestos bioactivos solubles en microcápsulas de gelatina y ácido hialurónico supone un problema con respecto a la carga de productos solubles en agua. La encapsulación del secretoma se ve afectada por esta limitación, puesto que gran parte sus componentes son biomoléculas solubles. La dificultad de la carga de este tipo de compuestos deriva del uso de disoluciones acuosas de gelatina y ácido hialurónico para llevar a cabo el recubrimiento de las microesferas, que permita el posterior licuado del núcleo interior de alginato generando las microcápsulas deseadas.

El secretoma de las MSCs u otras moléculas solubles presentan la posibilidad de ser encapsuladas en microesferas de alginato al disolverlas en la disolución acuosa de alginato utilizada como medio discontinuo en la síntesis de microesferas. De este modo las microesferas obtenidas estarían cargadas con las moléculas solubles de interés para su posterior liberación. Sin embargo, el paso siguiente para la obtención de microcápsulas es el recubrimiento por LBL de las microesferas con capas alternas de polielectrolitos. En este proceso, la mayor parte de las moléculas solubles cargadas en las microesferas se perderían como consecuencia de su difusión hacia las disoluciones acuosas de los polielectrolitos empeladas en el proceso.

Para hacer frente a la problemática que supone cargar biomateriales con compuestos solubles trabajando en medios acuosos, se llevará a cabo una doble emulsión. Mediante este sistema las moléculas solubles quedan protegidas al ser encapsuladas en el interior de nanopartículas (NP) de poliésteres biodegradables, que a posteriori pueden cargarse en microesferas de alginato u otros biomateriales, y trabajar con ellas sin riesgo de perder las moléculas cargadas.

1.9.1 Doble emulsión

La elección del proceso de encapsulación para proteger moléculas bioactivas depende de la hidrofiliidad o hidrofobicidad de las mismas. Las emulsiones simples son útiles para la encapsulación de agentes activos insolubles o poco solubles en agua (Iqbal et al., 2015), pero no es una técnica adecuada para agentes solubles. En este caso, la técnica más adecuada para su encapsulación es la doble emulsión (Becker Peres et al., 2016). Una doble emulsión consiste en dos emulsiones realizadas sucesivamente:

- Primera emulsión W/O. La fase acuosa contiene la molécula soluble de interés. La fase oleosa es una disolución del polímero (poliéster biodegradable) en un disolvente orgánico.
- Segunda emulsión W/O/W. Se emplea una nueva fase acuosa externa y la primera emulsión como la fase oleosa. En ambas emulsiones es conveniente el uso de tensioactivos o surfactantes para fomentar la estabilidad del sistema.
- Precipitación de las nanopartículas de polímero en la fase acuosa externa por evaporación del disolvente orgánico (Ding et al., 2019).

Se obtienen así gotas de la disolución acuosa de la molécula de interés dispersas en glóbulos de aceite (o polímero) dispersos en una fase acuosa externa (Ding et al., 2019) [Figura 5].

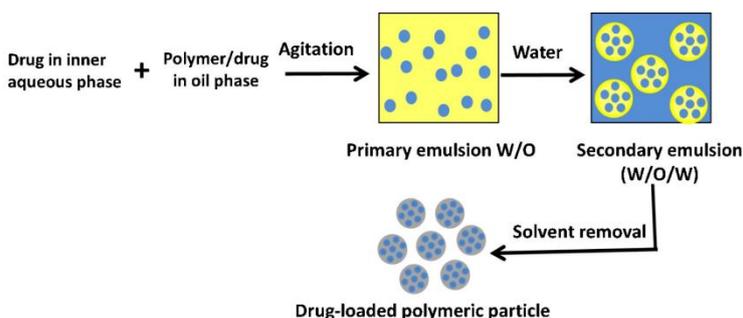


Figura 5. Representación del proceso de doble emulsión W/O/W (Iqbal et al., 2015).

El principal inconveniente del uso de emulsiones dobles es la optimización de diferentes variables para la producción de un tamaño de gota pequeño y homogéneo, un parámetro crítico para la estabilidad de la emulsión (Gharehbeglou et al., 2019a).

Una gran cantidad de estudios anteriores han utilizado la doble emulsión para encapsular compuestos solubles de interés que van desde hormonas como la insulina (Zhu et al., 2006), hasta fármacos antitumorales tales como mitomicina C (Hou et al., 2009), epirrubicina (Massadeh et al., 2021), o anastrozol (Alyafeeu et al., 2018), pasando por antibióticos como la ofloxacina y la vancomicina (Herrera et al., 2017), o metabolitos vegetales como la oleuropeína, (Gharehbeglou et al., 2019b).

En el caso de la doble emulsión planteada en este estudio, como fase oleosa se utilizará una disolución de ácido poli-L-láctico (PLLA) en diclorometano, y, como fase acuosa interna una disolución de la molécula/s bioactiva soluble. El objetivo final de la doble emulsión es la obtención de una fase acuosa externa con nanopartículas de ácido poliláctico dispersas, que contengan encapsulada en su interior la disolución acuosa de la molécula de interés en forma de pequeñas gotas monodispersas. El continuo acuoso de nanopartículas de PLLA puede ser disuelto junto a la disolución acuosa de alginato que da lugar a las microesferas, de forma que podrían obtenerse microesferas del alginato con nanopartícula de PLLA en su interior. De este modo, las moléculas solubles de interés quedan protegidas en nanopartículas de polímero dentro núcleo de alginato. Al recubrir las microesferas mediante LBL, no habrá riesgo de perder parte de las moléculas solubles, como consecuencia de su difusión hacia las disoluciones acuosas de polielectrolitos, puesto que estarán protegidas en las nanopartículas de PLLA.

1.9.2 Nanopartículas de PLLA

Los biopolímeros sintéticos son biomateriales ampliamente utilizados en ingeniería tisular. Entre ellos destacan: el ácido láctico- co -glicólico (PLGA), el ácido poliáctico (PLA) y la poli- ϵ -caprolactona (PCL) (Ding et al., 2019).

El ácido poli-L-láctico (PLLA) es uno de los dos estereoisómeros en los que existe el ácido poliláctico (PLA). En comparación con su estereoisómero PDLA, el PLLA presenta una mayor cristalinidad, estabilidad y resistencia a la degradación enzimática (Ribeiro et al., 2011), lo que explica que el PLLA es el compuesto biodegradable más duradero aprobado por la FDA (Fitzgerald et al., 2018).

El PLLA es uno de los biopolímeros de mayor relevancia debido a su versatilidad biocompatibilidad y biodegradabilidad a lo largo de la misma vía metabólica que el ácido láctico (Kang et al., 2020) (Capuana et al., 2022). Las nanopartículas de PLLA se degradan por la hidrólisis del polímero siguiendo una cinética de degradación lenta.

Una aplicación importante en cuanto al uso del PLLA es su utilización como soporte para la encapsulación de moléculas hidrofílicas en nano o micropartículas, permitiendo una elevada tasa de carga y un liberación controlada del contenido encapsulado (B. K. Lee et al., 2016).

2. OBJETIVOS

El mieloma múltiple es una enfermedad neoplásica de las células plasmáticas sanguíneas que actualmente no posee cura y requiere más investigación en muchos aspectos. Entre ellos destaca desarrollo de nuevos modelos in vitro de la enfermedad con el fin de poder estudiar las características de la misma fuera de un organismo vivo. Para alcanzar este objetivo es necesario el desarrollo de plataformas de cultivo que permitan recrear el microambiente tumoral donde se desarrolla la enfermedad, en ese caso, en la médula ósea, y las interacciones que tiene lugar entre los componentes allí presentes. Destaca en este contexto la interacción entre las células plasmáticas tumorales y las células madre mesenquimales de la médula ósea, MSCs. El co-cultivo de diferentes tipos celulares en una misma plataforma es costoso, por lo que se plantea la sustitución del uso de MSCs por la liberación controlada de su secretoma desde un biomaterial.

En este trabajo se estudiará la formación de microcápsulas de gelatina y ácido hialurónico por recubrimiento de microesferas de alginato mediante ensamblaje capa por capa (LBL), como sistema de transporte y liberación de compuestos bioactivos. Estudiando los tiempos de degradación de las microcápsulas en función del número de capas y su entrecruzamiento químico, se obtendrá un biomaterial modelo para futuros estudios de carga y liberación del secretoma de células madre mesenquimales.

La carga de compuestos solubles, como parte de las moléculas del secretoma, en microesferas funcionalizadas mediante LBL, presenta un alto riesgo de pérdida de las moléculas encapsuladas por difusión hacia las disoluciones acuosas empleadas. Para ello, en ese trabajo se abordará el mecanismo de protección de compuestos solubles mediante su encapsulado en nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico por doble emulsión.

Por tanto, los objetivos del trabajo experimental desarrollado son:

1. Producción de microesferas de alginato mediante microfluídica. Determinar la dispersión de tamaños de las partículas obtenidas.
2. Funcionalización de las microesferas mediante recubrimientos multicapa de gelatina y ácido hialurónico.
3. Estudio de la estabilidad de las microesferas al licuar el núcleo interior de alginato para la obtención de microcápsulas. Estudio de la evolución temporal de microesferas en medios de degradación hidrolítica y enzimática.
4. Producción de nanopartículas de PLLA y encapsulado en su interior de un producto soluble en disolución acuosa por el método de doble emulsión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y equipos

Para la síntesis de microesferas se requiere un medio discontinuo de alginato de sodio (Sigma-Aldrich), carbonato cálcico (CaCO₃) (Scharlab) y nanopartículas magnéticas de ferrita (Ferrotec Ferrofluid), un medio continuo de aceite de oliva virgen extra comercial y lecitina de soja (Guinama), y un medio colector igual que el continuo, pero al que se le añade ácido acético (Scharlab). Para el proceso de síntesis se requieren bombas de jeringa NE-4000 (New Era Pump Systems) con las que hacer circular los medios por el sistema de microfluidica fabricado en el laboratorio. El lavado de las microesferas se realiza con cloroformo (Scharlab) y agua destilada. Para el manejo de las microesferas se utilizan filtros de 60um de pluriStrainer (pluriSelect).

Para la funcionalización de microesferas mediante LBL se preparan disoluciones de base acuosa con agua miliQ, obtenida del equipo Direct-Q 3 System Millipore, de cloruro de calcio (CaCl₂), gelatina tipo A (Gelatin from porcine skin, gel strength 300, Type A), ácido hialurónico (Hyaluronic acid sodium salt from Streptococcus equi), N-hidroxisuccinimida (NSH) y N-(3 - dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), todos de Sigma-Aldrich. Para ajustar el pH de las disoluciones mediante el pH-metro PH50 (Violab), se emplea ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) de Scharlab. Durante la funcionalización se emplea un imán de niobio y un agitador PTR-35 Grant-Bio. Las microesferas funcionalizadas se almacenan en una disolución acuosa de cloruro de calcio con penicilina-estreptomicina (P/S, 10.000 unidades/ml P- 10.000 µg/ml S) (Gibco) y fungizona (Anfotericina B) (Gibco) para evitar su posible contaminación.

La caracterización morfológicas de las microesferas se lleva a cabo por microscopía óptica empleando el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100-F. Para la caracterización bioquímica de las microesferas, el ensayo BCA se lleva a cabo mediante el kit de análisis proteico de BCA (ThermoFisher) y una placa p96 para la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro VICTOR3 (Perkin Elmer), el análisis termogravimétrico (TGA) se lleva a cabo con el equipo Thermal 12icroflu excellence TGA/DSC 2 (Mettler Toledo,) y la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) con el espectrómetro ALPHA FT-IR (Bruker).

Previo al ensayo de estabilidad se realiza una tinción de las microesferas con azul de metileno (Methylene Blue hydrate) (Sigma-Aldrich). Los medios en los que se realiza el ensayo son: agua miliQ, medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) y medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con colagenasa (Colagenasa from Clostridium histolyticum, Type IA) (Sigma-Aldrich) y hialuronidasa (Hialuronidasa from bovine testes, Type IV-S) (Sigma-Aldrich). El ensayo de estabilidad se llevó a cabo sobre placas p24. Para la obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato de las microesferas se emplea ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (UltraPure 0,5 M) (Invitrogen).

En cuanto a la doble emulsión para la encapsulación de compuestos solubles, se llevó a cabo un primer protocolo para la síntesis de partículas de PLLA. Los reactivos empleados fueron: resómero R 202H Poly(D, L-lactida) (Sigma-Aldrich), ácido poli (L-láctico) Purasorb PL-18 (Corbion Purac), diclorometano (Scharlab), alcohol polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich) y agua miliQ. Para el proceso se requiere un equipo de dispersión de alto rendimiento T25 ULTRA-TURRAX (IKA), un agitador de hélices EUROSTAR 40 (IKA), y una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5804 R (Fisher). Posteriormente se estudió la encapsulación de rodamina B (Sigma-Aldrich) en las partículas obtenidas utilizando reactivos y equipos anteriores además de surfactantes Span85, Tween20, Span80 y Tween80 (todos de Sigma-Aldrich) y un homogeneizador ultrasónico SONOPULS HD (Bandelin).

3.2 Síntesis de microesferas de alginato

Para la síntesis de microesferas se requiere de un medio discontinuo, un medio continuo y un medio colector. El medio continuo y discontinuo son inmiscibles por lo que se crean microgotas cuando el medio continuo corta el medio discontinuo. Las microgotas son coaguladas fuera del sistema cuando el flujo de salida contacta con el medio colector. La presencia de ácido acético en este medio provoca una bajada del pH que da lugar a la disociación del carbonato cálcico en el interior de la microgota y a la liberación iones de calcio que permiten la reticulación del alginato. Los iones calcio y las cadenas de alginato establecen una interacción electrostática generando un entrecruzamiento reversible que da lugar a la solidificación por gelificación de las microesferas.

3.2.1 Preparación de disoluciones

- Medio discontinuo:

Disolución acuosa de alginato, carbonato cálcico y nanopartículas magnéticas de ferrita. Se prepara en varias fases:

- Solución de alginato a 3% p/v en agua miliQ. Dejar en agitación magnética 1 hora a 60°C.
- Solución de carbonato cálcico a 0,5 M en agua miliQ. Dejar en ultrasonidos 30 minutos.
- Solución de nanopartículas magnéticas de ferrita a 5% p/p respecto al alginato en 1 ml de etanol. Dispersar 30 minutos en ultrasonidos.
- Mezcla de la disolución de alginato y de carbonato cálcico en proporciones iguales obteniendo un 1,5% de alginato y carbonato cálcico 0,25 M.
- Adición de la solución de nanopartículas a y homogenización 4 horas en el Ultra-Turrax.

El uso de nanopartículas magnéticas de ferrita (MNPs) facilita la manipulación de las microesferas en pasos posteriores ya que son susceptibles a campos magnéticos y controlables con un imán. La disolución de MNPs se prepara en campana de extracción dentro de un tanque de metacrilato humidificado para impedir su salida.

- Medio continuo

Disolución oleosa de aceite de oliva al 1% p/p de lecitina de soja. Homogeneizar en agitación magnética a suave hasta la disolución total.

- Medio colector

Disolución oleosa de aceite de oliva al 1% p/p de lecitina de soja y 2% v/p de ácido acético. Homogeneizar en agitación magnética a suave hasta la disolución total.

3.2.2 Síntesis de microesferas mediante microfluidica

Para la síntesis se utiliza una sistema de microfluidica flow-focusing fabricado en el CBIT, bombas de jeringa para impulsar los medios y agujas de calibre grueso conectadas con capilares por donde circulan los medios hasta el sistema.

El medio discontinuo se carga en una jeringuilla de 3mL y 9,15mm de diámetro. El medio continuo en una de 60mL y 29mm de diámetro. Las jeringas se acoplan en las bombas y se regulan los caudales y diámetros para cada caso. El caudal del medio discontinuo es 1,5 mL /h y del medio continuo 60 mL /h. El medio colector es externo al sistema y mediante canales de silicona se hace coincidir el flujo de salida de sistema con el flujo de medio colector.

Desde las jeringas, se acoplan los capilares a la entrada del sistema y se bombean los medios. Simultáneamente se hace circular el medio colector. La intersección del medio discontinuo con el continuo rompe su flujo generando microgotas, que salen del circuito y se sumergen en el medio colector. La bajada del pH da lugar a la liberación de los iones calcio procedentes del carbonato cálcico, que permiten el entrecruzamiento reversible de las cadenas de alginato y la gelificación de las microesferas que serán recogidas en un vaso colector [Figura 6].

Se hace pasar todo lo recogido por un filtro de 60 μ m sobre un falcon de 50mL para eliminar el aceite sobrante y recuperar las microesferas, que son lavadas con cloroformo y agua destilada (3 veces). Se emplea un acople para hacer vacío y un pincel de silicona para facilitar el manejo. Las microesferas obtenidas se almacenan en la nevera en etanol 70%.

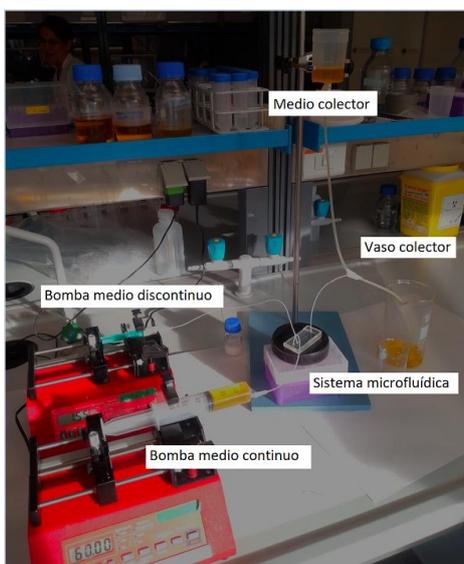


Figura 6. Montaje empleado para la síntesis de microesferas. Imagen tomada en el laboratorio.

3.3 Recubrimiento de microesferas mediante LBL

Se utiliza la técnica de ensamblado capa por capa (layer by layer, LBL) para el recubrimiento de las microesferas con gelatina A (Gel A) como polielectrolito positivo y ácido hialurónico (HA) como polielectrolito negativo. Las microesferas se sumergen en las disoluciones de los polielectrolitos de forma alterna haciendo dos lavados con agua intermedios.

Para el LBL se utilizan falcons de 15mL (uno para cada polielectrolito), tamices celulares de 60 μ m, falcons de 50mL, pipetas Pasteur, pincel de silicona, imán de niobio y agitador rotativo (la velocidad no es relevante, pero debe mantener las microesferas en suspensión).

Las condiciones estudiadas microesferas control sin recubrimiento (C), se sintetizarán microesferas con 3 bicapas sin entrecruzar (3L), 3 bicapas entrecruzadas (3T), 6 bicapas sin entrecruzar (6L) y 6 bicapas entrecruzadas (6T). El proceso es el mismo para la obtención de todas las condiciones variando el número de bicapas depositadas sobre las microesferas y el entrecruzamiento o no de las mismas.

3.3.1 Preparación de disoluciones

Son necesarias 4 disoluciones. Por cada 3 bicapas se emplean 15mL de disolución de cada polielectrolito (Gel A y HA), 200mL de disolución de lavados y 10mL de disolución de entrecruzamiento. Ajustar el volumen necesario al número de bicapas.

- Solución de Gelatina A
- Solución de gelatina A en agua miliQ a 1mg/ml y cloruro de calcio a 0,075M. Mantener en agitación magnética a 37°C al menos 1 hora.

- Solución de ácido hialurónico
- Solución de ácido hialurónico en agua miliQ a 1mg/ml y cloruro de calcio a 0,075M. Mantener en agitación magnética al menos 1 hora.

- Solución de lavados
- Solución de cloruro de calcio en agua miliQ a 0,075M. No requiere de agitación magnética.

Ajustar las tres disoluciones a pH 5.5 mediante soluciones de NaOH y HCl de baja molaridad.

- Solución de entrecruzamiento
- Solución de EDC a 60 mM en agua miliQ, NHS a 30mM y cloruro de calcio a 0,075M. Mantener en agitación magnética al menos 2 horas.

3.3.2 Recubrimiento por LBL

- Filtrar y recoger las microesferas de su almacenamiento. Acondicionar inicialmente durante 30 minutos con agua de lavados en agitación.
- Filtrar, recoger microesferas e introducirlas en la disolución de Gel A. Agitación 10 minutos.
- Desplazar las microesferas con el imán y con una pipeta Pasteur retirar únicamente la disolución de Gel A, pasándola por un tamiz para recuperar posibles microesferas retiradas. Almacenar la disolución de Gel A para las siguientes bicapas.
- Añadir agua de lavados. Agitación 10 minutos.
- Eliminar la mayor parte del agua filtrándola como se ha hecho con la Gela y repetir un segundo lavado. El agua de lavados empleada se desecha.
- Filtrar toda la solución, recoger microesferas e introducirlas en disolución de HA. Agitación 10 minutos.
- Realizar dos lavados (mismo proceso anterior). Pipeta Pasteur y tamiz diferentes para evitar que la mezcla de residuos. La disolución de HA se almacena. El agua de lavados, no.
- Tras el segundo lavado ya se ha obtenido una bicapa Gel A – HA. El proceso se repite tantas veces como sea necesario en función del número de bicapas requeridas.

Para el entrecruzamiento se sumergen las microesferas en EDC/NHS y se deja en agitación una noche. Al día siguiente se realizan dos lavados con agua. Las microesferas obtenidas, se almacenan en la nevera en agua de lavados con penicilina-estreptomicina (1% v/v) y fungizona (0,15% v/v) para evitar su contaminación.

3.4 Caracterización morfológica mediante microscopía óptica

Para la visualización de las microesferas se ha empleado el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100-F con una cámara integrada que permite la toma de imágenes. Las imágenes se analizaron mediante el software ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos). Se intentó aplicar la herramienta “Threshold” para poder obtener valores de diámetro Feret, superficie y circularidad, pero al procesar las imágenes no se definían correctamente las microesferas. Por ello, se midió el diámetro mayor y menor de 230 microesferas obteniéndose el diámetro medio de cada una ellas para conocer la distribución de tamaños de la población estudiada.

3.5 Caracterización bioquímica

3.5.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica para la determinación de la fracción de componentes de una muestra (Rajisha et al., 2011) mediante el registro de la pérdida de peso de la muestra durante un proceso de calentamiento programado (Yao et al., 2022). Cuando se alcanzan una energía térmica superior a la energía de los enlaces, se desprenden fracciones volátiles de las moléculas y se detecta una disminución de la masa. Se realizó un TGA para cada una de las condiciones de microesferas: C, 3L, 3T, 6L y 6T, con dos réplicas por condición. Las muestras se calentaron de 25°C a 1000°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, utilizando nitrógeno como gas de purga a un flujo de 50 mL/min. El objetivo del TGA es determinar qué parte del peso de las microesferas corresponde al recubrimiento de gelatina/ácido hialurónico, para ello se comparan las derivadas del peso normalizado por el peso seco con respecto a la temperatura de las microesferas con y sin recubrimiento.

3.5.2 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) permite identificar los componentes de una muestra, puesto que los grupos funcionales y enlaces de las moléculas presentan picos de absorción característicos que se visualizan tras irradiar la muestra. Se realizó un FTIR para cada componente puro (alginato, Gel A y HA) y para cada condición estudiada (C, 3L, 3T, 6L y 6T), con dos réplicas por condición. Se analiza el espectro en modo ATR desde 4000cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, con una resolución de 4cm⁻¹. Las medidas obtenidas se emplean para identificar picos característicos y desplazamientos de longitud de onda.

3.5.3 BCA

El ensayo de cuantificación de proteínas BCA se basa en la reacción de Biuret. El Cu²⁺ se reduce a Cu⁺ al unirse a enlaces peptídicos, y los iones Cu⁺ liberados se acomplejan con el ácido bicinconínico (BCA) cambiando de color a púrpura intenso, con lo que puede determinarse la concentración de proteína en la muestra midiendo la absorbancia a 562 nm. En este caso, el ensayo BCA se emplea para determinar la concentración de gelatina A en las microesferas estudiadas. El ácido hialurónico no es cuantificado, pero se asume que; a mayor concentración de Gel A, mayor concentración de HA, ya que cada capa de Gel A no puede depositarse si antes no lo ha hecho una de carga opuesta, en este caso de HA. Se emplea el kit BCA de Thermo Fisher. Se realiza una curva de calibrado desde 2mg/mL a 0mg/mL gelatina con 2 réplicas biológicas por concentración. Siguiendo las instrucciones del kit se preparan las muestras de cada condición (C, 3L, 3T, 6L y 6T) con 3 réplicas biológicas por muestra, cada una de las cuales se midió por triplicado. El ensayo se llevó a cabo en una placa multipocillo p96 y la absorbancia se lee mediante un espectrofotómetro Victor3 [Figura 7].

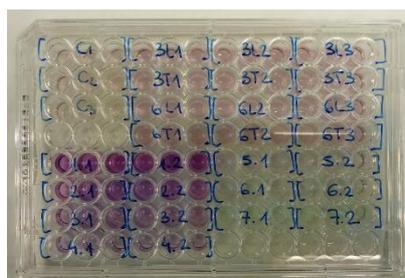


Figura 7. Ensayo BCA. Del 1 al 7 las disoluciones de la curva de calibrado. Condiciones estudiadas: C, 3L, 3T, 6L y 6T.

3.6 Ensayo de estabilidad

3.6.1 Evolución de las microesferas en medios de degradación hidrolítica y enzimática

El objetivo del ensayo de estabilidad es comprobar la existencia o no de diferencias en cuanto a la estabilidad y degradación de las condiciones de microesferas estudiadas (C, 3L, 3T, 6L y 6T) en diferentes medios y a diferentes tiempos en función del número de bicapas y el grado de entrecruzamiento. El hidrogel de alginato que conforma las microesferas se mantiene por un entrecruzamiento iónico reversible entre los iones calcio y las cadenas de alginato. Como consecuencia, los iones Ca^{2+} pueden migrar fuera de la microesfera, que dejan de estar reticuladas y pierden su estabilidad.

Las condiciones estudiadas en el ensayo fueron: C, 3L, 3T, 6L y 6T, a tiempo 0, 2, 7 y 22 horas en agua, medio de cultivo RPMI 1640 y medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con enzimas. (colagenasa y hialuronidasa a una concentración final de 200ng/mL y 13ng/mL respectivamente, ambas enzimas están presentes en la médula ósea y son capaces de degradar el recubrimiento). Para cada muestra en cada medio, se realizaron 3 réplicas. A cada medio se añadió penicilina-estreptomicina (1% v/v) y fungizona (0,15% v/v) para evitar contaminaciones.

Previo al ensayo de estabilidad se tiñeron las microesferas con disolución de azul de metileno a 0,1mg/mL. Tras la tinción, se lavaron con agua miliQ y se resuspendieron en los medios mencionados. Las preparaciones se distribuyeron sobre placas multipocillo p24 de forma que en cada pocillo había de 8µL de microesferas. A cada pocillo se añade la cantidad restante de medio (agua o RPMI 1640 tratados con antibióticos) hasta alcanzar 1mL. Las placas se visualizan bajo el microscopio óptico invertido tomando imágenes para su posterior análisis [Figura 8].

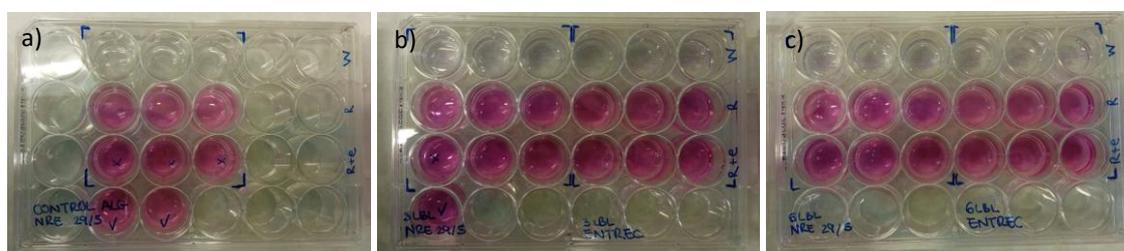


Figura 8. Placas p24 del ensayo de estabilidad. a) Control sin recubrimiento, b) 3 LBL (sin entrecruzar y entrecruzado), c) 6 LBL (sin entrecruzar y entrecruzado). W = agua. R = medio de cultivo RPMI 1640. R +E = RPMI 1640 suplementado con enzimas.

3.6.2 Obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato

Se estudia la obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato de las microesferas recubiertas en presencia de EDTA, un quelante del calcio. Al secuestrar al catión del interior de la microesfera, pasa a estar licuado puesto que se pierde entrecruzamiento reversible entre las cadenas de alginato. De este modo se generan microcápsulas huecas que mantienen su integridad gracias al recubrimiento de GelA/HA. Las microcápsulas obtenidas son de interés para la encapsulación de numerosos compuestos bioactivos. Para llevar a cabo el licuado de las microesferas, una muestra de microesferas recubiertas con 6 bicapas entrecruzadas se trata con EDTA. Se ensaya la condición más fuerte de para comprobar su resistencia. Si no resiste, tampoco lo harán los recubrimientos menos consistentes. Se observa al microscopio las microesferas antes y después del tratamiento.

3.7 Doble emulsión

3.7.1 Producción de micropartículas de PLLA. Emulsión O/W

Para la síntesis de partículas de PLLA mediante una emulsión simple O/W una fase oleosa, disolución polimérica en disolvente orgánico, es emulsionada en una fase acuosa para la obtención de partículas tras la evaporación del disolvente.

Para un primer acercamiento se utilizó el resómero R 202H de PLLA, pero las partículas obtenidas no mostraban la consistencia deseada. Se llevó a cabo el mismo protocolo con un PLLA de mayor peso molecular. Brevemente, el protocolo para la obtención de partículas de PLLA es: preparación de PVA al 4% p/v en agua miliQ y agitación magnética a 250 rpm, 90°C durante 30 minutos (disolución acuosa), preparación de PLLA al 2% p/v en diclorometano y agitación magnética 1 hora (disolución orgánica u oleosa), goteo de la disolución orgánica desde una bomba ajustada con caudal 0,5mL/min sobre la disolución acuosa agitada en el Ultra-Turrax a 10.000 rpm, traspaso de la emulsión al agitador de espas a 450 rpm y adición de 50mL de agua miliQ, agitación overnight en campana de extracción para la evaporación del diclorometano. Para la recuperación y lavado de las partículas: centrifugación 1 hora a 20.800G y 25°C, descarte del sobrenadante, tres lavados con agua miliQ y centrifugaciones de 40 minutos a 20.800G y 25°C, resuspensión de partículas en agua miliQ y almacenamiento a -80°C o liofilización

Se obtuvieron partículas de PLLA de un tamaño superior al deseado. No pueden considerarse nanopartículas puesto que no son de rango nanométrico sino micrométrico.

3.7.2 Encapsulación de un compuesto soluble. Emulsión W/O

Para la encapsulación de un compuesto soluble en un continuo polimérico mediante una emulsión W/O, se requiere emulsionar una disolución acuosa de la sustancia a encapsular (en este caso rodamina) en una disolución orgánica (diclorometano) de PLLA. De este modo se obtiene un continuo de PLLA con pequeñas gotas monodispersas y estables de la disolución acuosa de rodamina. La emulsión obtenida será utilizada como fase orgánica para una segunda emulsión idéntica a la descrita en el apartado anterior (doble emulsión completa), y obtener así una disolución acuosa de partículas de PLLA cargadas con rodamina.

El proceso de primera emulsión fue: preparación de la disolución orgánica de PLLA al 2% p/v en DCM, agitación magnética durante 1 hora y adición de Span85, preparación de la disolución acuosa de rodamina a 1mg/mL, incorporación de la disolución acuosa a la disolución orgánica en agitación en el Ultra-Turrax 8 minutos a 10.000 rpm. Tras de retirar la emulsión de la agitación, ambas fases se separan, por lo que es una emulsión inestable.

Con el objetivo de conseguir una primera emulsión estable con nanogotas monodispersas en el continuo polimérico, se llevan a cabo una serie de modificaciones en el proceso anterior: uso de surfactantes combinados hidrofóbicos e hidrofílicos ajustando un valor de balance hidrófilo-lipofílico (HLB) cercano a 6, de modo aumentará la estabilidad de la emulsión tal y como se concluye en los trabajos de M.G. Song et al. (M.-G. Song et al., 2002) (M. G. Song et al., 2000), reducción del volumen de disolución acuosa frente la disolución orgánica hasta una proporción adecuada dentro del rango recomendado por Ramazani et al. (Ramazani et al., 2016), trabajo en hielo para reducir la espuma y acercar viscosidades entre fases, y aumento del tiempo y velocidad de agitación en el Ultra-Turrax para generar nanogotas de menor tamaño.

Tras aplicar las modificaciones, el protocolo seguido fue: preparación de la disolución orgánica y de la disolución acuosa del mismo modo que en proceso anterior (pero añadiendo Tween20 a la

disolución acuosa), incorporación de la disolución acuosa a la disolución orgánica en el Ultra-Turrax 15 minutos a 15.800 rpm en baño hielo. De nuevo, tras de retirar la emulsión de la agitación, ambas fases se separan rápidamente, por lo que se trata de una emulsión inestable.

Finalmente se llevó a cabo un proceso similar empleando un homogeneizador ultrasónico y el par de surfactantes Span80 y Tween80, ajustando las cantidad requeridas para un HLB de 6. Se prepararon las disoluciones y se añadieron los surfactantes correspondientes a cada fase (Span80 a la disolución orgánica y Tween80 a la disolución acuosa). Ambas fases se emulsionaron por ultrasonidos a amplitud 60%, en baño de hielo, durante 5 minutos con ciclos de 50" on y 10" off. Al retirar la emulsión del ultrasonidos parece estable, pero tras pocos minutos en estático las fases se separan. No se ha conseguido la estabilidad de la emulsión.

A pesar de no haber logrado un método eficaz de emulsión simple W/O para obtener un continuo polimérico de PLLA con pequeñas gotas monodispersas y estables de la disolución acuosa de interés, se han avanzado en la optimización de parámetros clave. Se conoce qué procesos conllevan un resultado negativo y qué alternativas pueden aplicarse para lograr alcanzar el objetivo final y conseguir una doble emulsión que permita la encapsulación de un compuesto soluble de interés en nanopartículas de PLLA.

3.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos llevados a cabo en este trabajo se han realizado mediante el software GraphPad Prism9 con el objetivo de estudiar la existencia o no de diferencias significativas entre determinadas condiciones o conjunto de condiciones. Para ello en primer lugar se realiza un test de identificación de outliers para eliminar los valores anómalos del conjunto de datos estudiado. Posteriormente se analiza la normalidad de los datos mediante un test Shapiro-Wilk para conocer si los datos se asocian una distribución normal. En función de si el test de normalidad resulta positivo o negativo, se realiza un test de significancia estadística distinto. Si los datos analizados pasan el test de normalidad se lleva a cabo un test paramétrico ANOVA para comparaciones múltiples o un T-Test para comparaciones por pares. En cambio, Si los datos analizados no siguen una distribución normal se realiza un test no paramétrico Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples o un test Mann Whitney para comparaciones por pares. En función del p-valor obtenido en los test de significancia estadística podrá considerarse si existen o no diferencias significativas entre las condiciones comparadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Microesferas de alginato. Dispersión de tamaños.

Las microesferas de alginato fueron obtenidas mediante microfluídica. Por fuerzas de corte entre los medio empleados se generan microgotas de alginato y carbonato cálcico que posteriormente gelifican (consistencia de hidrogel) por entrecruzamiento iónico reversible entre los iones calcio y las cadenas de alginato. Todo el proceso ha sido detallado en el apartado 3.2.

Microesferas control sin recubrimiento fueron visualizadas al microscopio óptico tomándose imágenes para su posterior análisis de dispersión de tamaños. Las imágenes capturadas se procesaron mediante el software de análisis de imágenes ImageJ. Para el estudio de los parámetros característicos de las microesferas (diámetro Feret, superficie y circularidad) se aplicó la herramienta “Threshold”, sin embargo, gran parte de las microesferas no eran detectadas. Por ello, se decidió estudiar el diámetro de las microesferas como parámetro base para la dispersión de tamaños. Las microesferas presentaban una forma redondeada, pero al no ser completamente circulares no podía obtenerse un único diámetro. Para acercarse al diámetro al valor más representativo, se midió el diámetro mayor y menor para obtener el diámetro medio de cada microesfera. Fueron analizadas 230 microesferas [Figura 9].

Los diámetros medios obtenidos fueron analizados con el software GraphPad Prism 9 para eliminar los valores anómalos (outliers). Aplicando el método ROUT (Q = 5%) se detectaron 7 valores anómalos que fueron eliminados. Con los datos limpios se calcularon los estadísticos descriptivos [Tabla 1] y se llevó a cabo un histograma para conocer la dispersión de tamaños de las microesferas estudiadas [Figura 9] ajustando los rangos de los intervalos a 20 μm .

Tabla 1. Diámetro de las microesferas control de alginato. Las imágenes fueron analizadas mediante ImageJ obteniendo los datos numéricos. La estadística asociada se realizó mediante GraphPad Prism 9.

Muestra	N total	Media (μm)	Desviación estándar (μm)	Mediana (μm)
Microesferas alginato	223	155,89	29,92	150,66

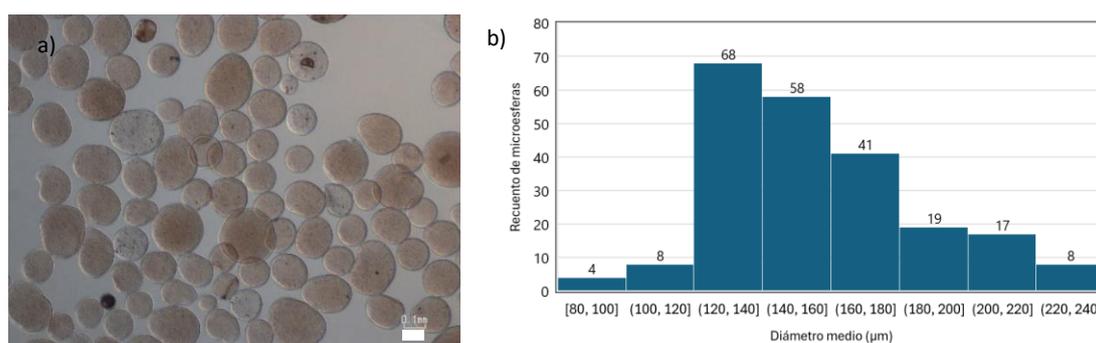


Figura 9. Microesferas control de alginato a) Visualización al microscopio óptico. Imagen representativa de un total de 8 imágenes empleadas en el recuento de diámetros. Escala: 100 μm . b) Histograma de los diámetros medios de las microesferas analizadas.

El valor promedio del diámetro de las microesferas es de $155,89 \pm 29,92 \mu\text{m}$, un valor cercano al obtenido en trabajos similares anteriores. García-Briega et al. obtuvieron un diámetro medio de 150 -200 μm aplicando un flujo discontinuo y continuo de 1,55 y 40mL/h respectivamente (García-Briega et al., 2022). Por su parte, Marín-Payá et al. sintetizaron microesferas de diámetro medio 170 -190 μm trabajando con un medio discontinuo a 7,8mL/h y un medio continuo a 372mL/h (Marín-Payá et al., 2021).

Los procesos de obtención de microesferas por microfluídica se caracterizan por dar lugar a distribuciones de tamaño estrechas ya que permiten la obtención de microesferas con tamaños muy controlados. La distribución obtenida es ligeramente más ancha de lo esperado, lo que puede explicarse por la posible fusión de microesferas durante la coagulación o gelificación a la salida del sistema. Sin embargo, la anchura obtenida sigue considerándose adecuada, ya que es mucho más estrecha en comparación con otros métodos de síntesis de microesferas, como la emulsión, que dan lugar a tamaños mucho más variables y distribuciones mucho más anchas.

En la dispersión de tamaños representada en el histograma se aprecia que la mayoría de las microesferas estudiadas poseen un diámetro medio de entre 120 y 180 μm , acorde con los parámetros estadísticos descriptivos calculados. Ese rango de tamaños es cercano también a los observados en estudios similares. Puede considerarse que la síntesis de microesferas de alginato ha sido adecuada y se han obtenido microesferas de tamaño coherente al esperado.

4.2 Caracterización bioquímica de microesferas funcionalizadas mediante LBL de GeIA/HA

4.2.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA permite demostrar la presencia del LBL sobre las microesferas al justificar que parte del peso de las mismas corresponde al recubrimiento de gelatina y ácido hialurónico. El aumento del peso del recubrimiento respecto al peso total de la microesfera tras cada bicapa es complejo de cuantificar al ser un valor pequeño, por ello, este ensayo se basa en la disminución de la fracción en peso del alginato con respecto al peso total de la microesfera conforme se forma el recubrimiento. Se compara la derivada respecto a la temperatura del peso normalizado por el peso seco de las microesferas sin recubrimiento frente las diferentes condiciones recubiertas. Se obtiene qué porcentaje representa el recubrimiento respecto al peso total de la microesfera en cada condición analizada, variando el número de bicapas y el grado de entrecruzamiento.

El equipo análisis termogravimétrico registra la pérdida de peso de la muestra conforme aumenta la temperatura. Cuando se alcanzan una energía térmica superior a la energía de enlace, éstos se rompen y se desprende un grupo molecular volátil detectándose una disminución del peso. A los 200 $^{\circ}\text{C}$ la muestra ha perdido el agua por deshidratación y el peso resultante es el peso seco de la muestra. A partir de ese punto, la temperatura sigue aumentando y los grupos volátiles se evaporan generando caídas de peso. El rango de temperatura analizado en este trabajo será de 200 a 350 $^{\circ}\text{C}$, a pesar de que el equipo alcanza temperaturas mucho más elevadas registrando un gran número de datos.

Al representar gráficamente el peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura se visualiza la caída progresiva del peso en función del aumento de temperatura en forma de escalones, donde cada escalón corresponde a una caída del peso a una cierta temperatura (o a un rango estrecho de temperatura) [Figura 10].

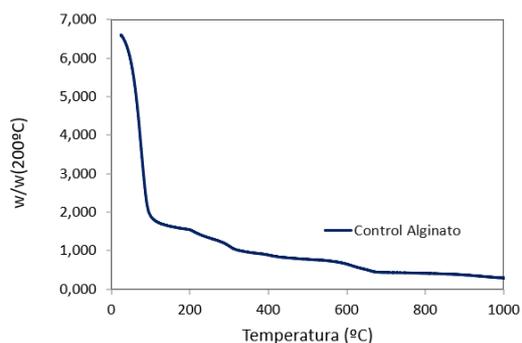


Figura 10. TGA sobre microesferas control del alginato sin recubrimiento. Curva del peso normalizado por el peso seco (eje Y) frente a la temperatura (eje X).

Para poder cuantificar la caída del peso con cada aumento de temperatura, se calcula la derivada respecto a la temperatura del peso normalizado por el peso seco. En la representación gráfica las caídas de peso se convierten en una sucesión de picos. Realizando una deconvolución es posible individualizarlos y calcular el área de cada uno. Este estudio se basa en los dos primeros picos de degradación térmica del alginato que, como se comentará a continuación, suponen una pérdida de peso de alrededor del 30% de su masa antes de llegar a 350°C. En las esferas con recubrimiento, la pérdida de peso debida a estos dos picos del alginato disminuirá proporcionalmente a la fracción de alginato en la muestra control sin recubrimiento.

Para cada muestra, la curva de la derivada se ha modelizado en esta zona con dos gaussianas o distribuciones normales que son ajustadas para reproducir los picos de interés. La suma de las gaussianas coincide con los dos picos de degradación del alginato de la derivada original [Figura 11]. El ajuste de las gaussianas se realiza con la misma desviación estándar para todas las muestras, homogeneizando los datos para comprar entre las diferentes condiciones de estudio.

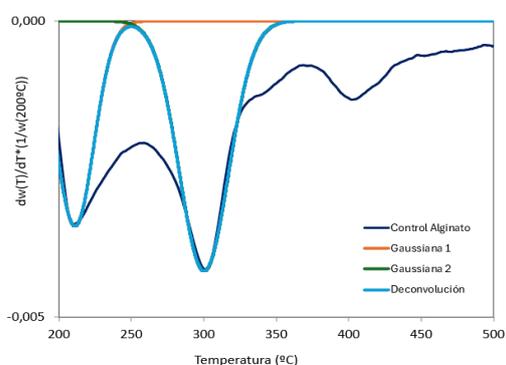


Figura 11. TGA en microesferas control del alginato sin recubrimiento. Curva derivada del peso normalizado por el peso seco (eje Y) frente a la temperatura (eje X) (azul oscuro). La curva en el rango de estudio es modelizada con dos distribuciones normales o gaussianas (naranja y verde). Al sumar ambas se obtiene una curva coincidente con los picos de interés de la derivada original (azul claro).

Al comparar la derivada obtenida en las microesferas control frente a las microesferas con recubrimiento de 6 bicapas GElA /HA (6L), los picos correspondientes a degradación o caída de peso del alginato son más pequeños en las microesferas recubiertas que en las microesferas control. Es decir, en las microesferas recubiertas el alginato representa una menor fracción del peso total de la microesfera debido a la presencia del recubrimiento, que representará una fracción peso total de la microesfera cada vez mayor a medida que aumente el número de bicapas formadas [Figura 12].

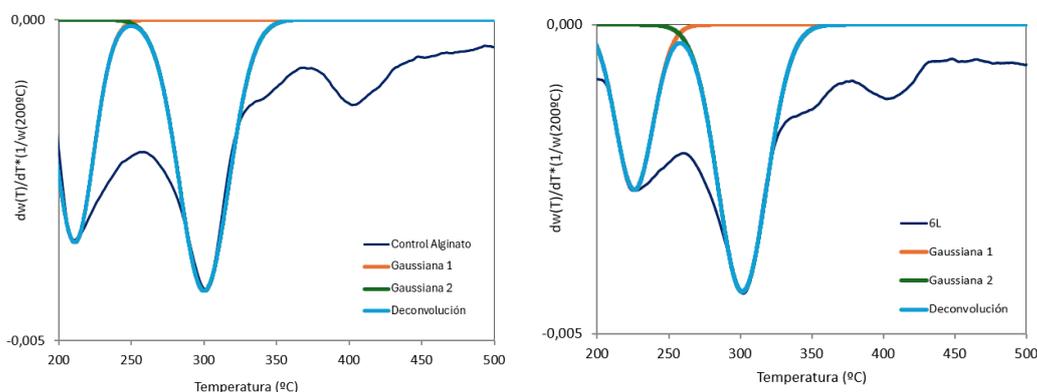


Figura 12. TGA en microesferas control del alginato sin recubrimiento y microesferas con recubrimiento de 6 bicapas sin entrecruzar (6L). Comparación de la curva derivada del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura. Los picos de las microesferas 6L son menos pronunciados que en el caso de las control puesto que presentan un menor porcentaje de alginato respecto al peso total de la microesfera.

Las curvas del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura y sus correspondientes derivadas y ajustes para cada una de las condiciones de recubrimiento estudiadas se adjuntan en el Anexo I.

Para poder cuantificar el porcentaje del peso que representa el alginato con respecto al peso total de la muestra en cada condición, se calcula el área bajo la curva de cada una de las dos gaussianas y se suman los valores, obteniendo el área total de la curva de la derivada original. De este modo se obtiene la fracción del peso de alginato que se ha perdido en los dos primeros picos asociados su degradación térmica (caída del peso) en ese rango de temperatura.

En primer lugar, se realiza el cálculo para la muestra control (microesferas sin recubrimiento). Posteriormente, calculando la fracción mencionada para cada una de las condiciones de recubrimiento con respecto la condición control, se obtiene el porcentaje del peso que representa el alginato con respecto al peso total de la muestra en cada condición. Tomando como referencia que las microesferas control son únicamente alginato (fracción de alginato del 100%), calculando la diferencia, se obtiene porcentaje en peso que representa el recubrimiento (LBL) con respecto al peso total de la muestra en cada condición [Tabla 2].

En este trabajo se realizaron dos réplicas de TGA por muestra. Para cada muestra, el resultado obtenido es la media de los dos conjuntos de datos trabajados en cada caso.

Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar los datos del TGA de todas las muestras estudiadas. Siendo "Control" microesferas sin recubrimiento, "3L" microesferas con 3 bicapas Gela/HA sin entrecruzar, "3T" microesferas con 3 bicapas Gela/HA entrecruzadas, "6L" microesferas con 6 bicapas Gela/HA sin entrecruzar y "6T" microesferas con 6 bicapas Gela/HA entrecruzadas. La "Fracción LBL %" indica porcentaje en peso que representa el recubrimiento con respecto al peso total de la muestra en cada condición.

Muestra	Área Normal 1	Área Normal 2	Suma Áreas	Media	Fracción Alginato (%)	Fracción LBL (%)
Control	0,113	0,180	0,293	0,303	100	0
	0,123	0,190	0,313			
3L	0,094	0,183	0,277	0,283	93,48	6,52
	0,105	0,185	0,290			
3T	0,114	0,188	0,302	0,291	95,87	4,13
	0,090	0,189	0,279			
6L	0,087	0,184	0,271	0,279	92,03	7,97
	0,102	0,185	0,287			
6T	0,095	0,188	0,283	0,289	95,43	4,57
	0,108	0,187	0,295			

Los datos resultante de la Tabla 2 muestran cómo conforme aumenta el número de bicapas disminuye la fracción del peso de alginato respecto a la masa total de las microesferas, y aumenta la fracción del peso del recubrimiento. Esto demuestran la presencia de recubrimiento sobre las microesferas funcionalizadas y cómo este aumenta a medida que depositan las bicapas. Las condiciones entrecruzadas presentan un porcentaje menor de recubrimiento, es posible que parte de éste se pierda durante el entrecruzamiento.

Cabe destacar que en todas las muestras los dos picos de degradación térmica del alginato aparecen muy distanciados entre ellos, lo que no permite ajustar con exactitud la suma de las gaussianas como para reproducir la curva de la derivada original. Sería necesario modelizar con un número mayor de gaussianas. Debe tenerse en cuenta que las muestras analizadas, fueron almacenadas en agua con penicilina/estreptomina y fungizona para evitar contaminaciones. A pesar de la baja proporción en la que se encontraban, se decidió realizar un TGA para una muestra seca de un mix de los tres compuestos para analizar si su degradación térmica y si las caídas de peso podrían interferir en las muestras estudiadas [Figura 13].

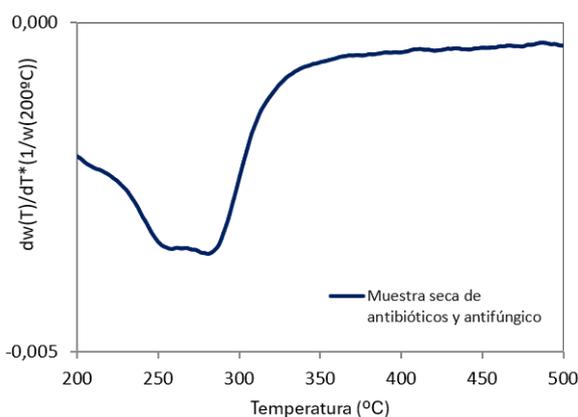


Figura 13. TGA de una muestra seca de penicilina/estreptomicina y fungizona. Curva derivada del peso normalizado por el peso seco respecto a la temperatura.

El mix preparado con antibióticos y antifúngico muestra un amplio pico coincidente con la zona de aparición de los picos estudiados de degradación del alginato, lo que implica que posiblemente haya un solapamiento de los picos que explica el distanciamiento hacia mayores temperaturas impidiendo el ajuste correcto de la suma de las gaussianas.

4.4.4 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Para demostrar la presencia alginato, gelatina y ácido hialurónico en las microesferas recubiertas se realiza un ensayo de FTIR. Este ensayo permite identificar los componentes de una muestra puesto que sus enlaces químicos vibran a frecuencias específicas generando picos de absorción característicos asociados a ellos y a los grupos funcionales que forman. Mediante el equipo disponible en el laboratorio y software de espectroscopía OPUS7.8 se realizaron medidas de la condición control sin recubrimiento y de cada una de las cuatro condiciones de recubrimiento estudiadas (dos réplicas por condición y su media posterior). También se realizó una medida de cada componente puro presente en la muestra (solo una réplica).

Las medidas de 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} , con una resolución de 4cm^{-1} , generaron los datos de transmitancia con los que obtener el espectro propio de cada muestra. Los espectros obtenidos comparten valores de longitud de onda por lo que todos ellos (componentes puros, condición control y condiciones de recubrimiento estudiadas) fueron representados en conjunto. Para facilitar la comparación de los espectros y la identificación de picos característicos se representan desplazando las curvas unas respecto a otras en sentido vertical. De este modo las curvas quedan separadas entre sí 0,1 unidades en el eje y entre compuestos puros y 0,2 unidades entre condiciones estudiadas.

Al comparar las condiciones sin y con recubrimiento, se espera encontrar picos diferenciales correspondiente a la presencia de los polielectrolitos. El HA y el alginato no presentan una picos diferenciales entre ambos, pero la Gel A y el alginato sí, y será unos de los picos de interés. Las condiciones de recubrimiento no se diferencian en componentes, pero sí en enlaces amidas formados por el entrecruzamiento entre carboxilos y amino con EDC/NHS.

Entre los compuestos puros y las muestras hidratadas puede diferenciarse un pico de gran amplitud en la a región entre 3600 y 3000cm^{-1} presente únicamente en las muestras hidratadas puesto que es característicos de los enlaces OH del agua [Figura 14]. Alrededor de 2900cm^{-1} un pico característico asociado a la vibración de estiramiento del CH en alginato, Gela y HA, se desdobra en dos picos a 2840cm^{-1} y 2917cm^{-1} únicamente en las microesferas recubiertas. Al no observarse en las microesferas control, puede atribuirse a interacciones entre los polielectrolitos empleados (Marín-Payá et al., 2021) [Figura 14].

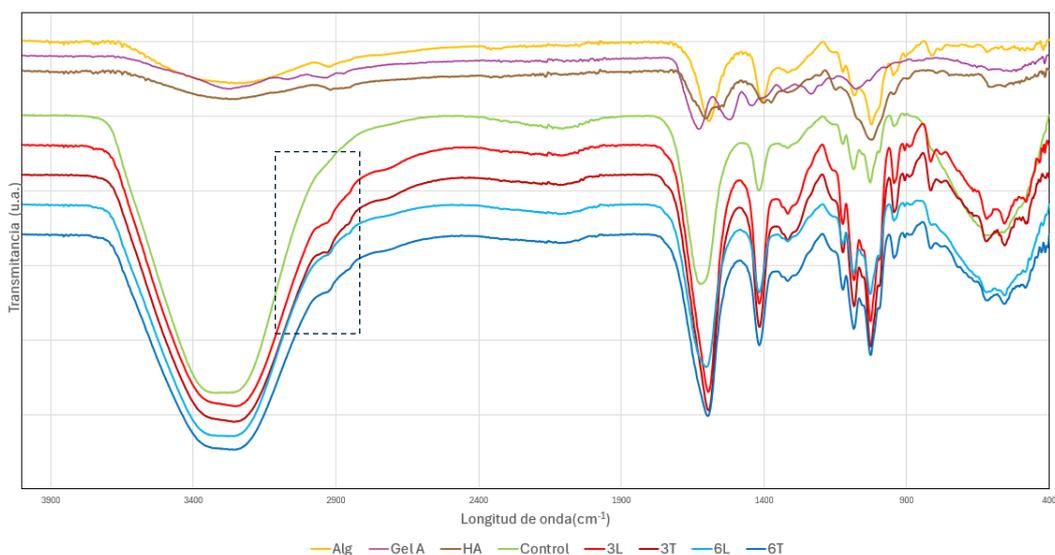


Figura 14. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier de polvo de alginato (Alg) (amarillo), polvo de gelatina A (Gel A) (morado), polvo de ácido hialurónico (HA) (marrón), muestra control de microesferas sin recubrimiento (Control) (verde), muestra de microesferas con 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (3L) (rojo), muestra de microesferas con 3 bicapas GelA/HA entrecruzadas (3T) (rojo oscuro), muestra de microesferas con 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (6L) (azul) y muestra de microesferas con 6 bicapas GelA/HA entrecruzadas (6T) (azul oscuro). Las curvas están separadas en el eje Y 0,1 unidades entre compuestos puros y 0,2 unidades entre condiciones estudiadas. Eje X de 4000 a 400 cm^{-1} .

La mayoría de las diferencias que se observan entre las diferentes microesferas realizadas en este trabajo se corresponden con el intervalo del espectro que va desde 1900 y 400 cm^{-1} [Figura 15]. El alginato puro presenta un pico característico en 1410 cm^{-1} por el estiramiento simétrico del grupo COO (Marín-Payá et al., 2021). Este pico está presente en todas las muestras, puesto que todas contiene alginato. Es probable que este pico esté solapado con al pico en 1420 cm^{-1} asociado a la vibración de los grupos carbohidrato presentes en todos los materiales.

Entre 1130 y 1000 cm^{-1} tanto en el alginato puro como en las microesferas control sin recubrimiento se diferencian tres picos en 1112, 1075 y 1018 cm^{-1} debido a las vibraciones de los grupos carbonilo y éter en la región de los carbohidratos (García-Briega et al., 2022). En el caso de las muestras recubiertas con se identifican picos similares que pueden presentar pequeños desplazamientos por las interacciones existentes entre los compuestos.

El alginato puro presenta un pico característico alrededor de 1600 cm^{-1} asociado a los enlaces cetónicos simétricos de su estructura (García-Briega et al., 2022). Este pico en las microesferas sin recubrimiento se encuentra desplazado hacia una longitud de onda mayor cuando debería quedarse en la misma posición, mientras que en las microesferas con recubrimiento permanece en una posición similar a la inicial cuando debería desplazarse hacia longitudes de onda mayores debido a la superposición de este pico con el pico del enlace amida (1630 cm^{-1}) característico del entrecruzamiento y la gelatina. El hecho de que el pico a 1600 cm^{-1} en las microesferas control aparezca a una longitud de onda mayor que en el caso de las microesferas recubiertas, podría explicarse por la presencia diferencial del GelA y HA en las microesferas recubiertas.

Debido a que el pico característico de las amidas a 1630 cm^{-1} se encuentra desplazado hacia longitudes de onda menores y se solapa con otros picos, no permite la diferenciación entre condiciones no entrecruzadas y entrecruzadas que podrían diferenciarse por la ausencia o presencia de este pico, y tampoco permite la diferenciación de este pico diferencial de la gelatina entre microesferas con y sin recubrimiento.

El ácido hialurónico muestra un pico característico en 1315 cm^{-1} correspondiente a la vibración de CH (Marín-Payá et al., 2021) presente de forma diferencial en las microesferas con recubrimiento GelA/HA, mientras que no se aprecia en las microesferas control, puesto que no poseen HA entre sus componentes.

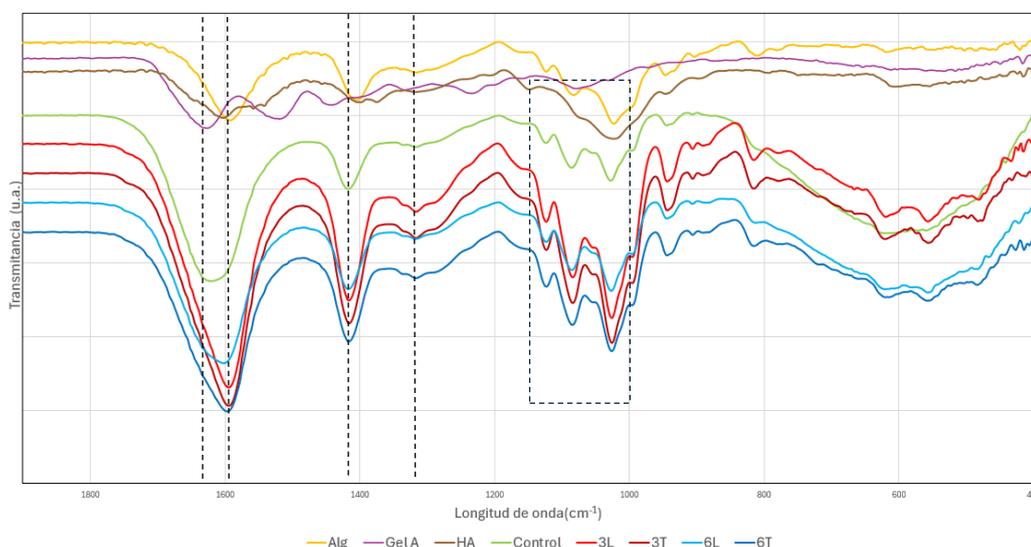


Figura 15. Ampliación entre 1900 y 400 cm^{-1} de los espectros mostrados en la figura anterior.

La comparación de espectros obtenidos por FTIR demuestra la presencia común del alginato en todas las microesferas y la presencia diferencial de gelatina y ácido hialurónico en las microesferas con recubrimientos. Por tanto, refuerza la comprobación de un LBL GelA/HA correcto sobre las microesferas de alginato.

4.4.5 BCA

El objetivo del ensayo de BCA realizado en este trabajo es conocer la concentración de gelatina A presente en las muestras de cada una de las condiciones de recubrimiento estudiadas (microesferas recubiertas con 3 bicapas GelA/HA, 3 bicapas entrecruzadas, 6 bicapas y 6 bicapas entrecruzadas) y comprobar si existen diferencias significativas entre ellas. El ensayo BCA se basa en el cambio de coloración del medio cuando los iones Cu^+ liberados, por la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ al unirse a los enlaces peptídicos de la gelatina, se acomplejan con el BCA. Se mide la absorbancia del sobrenadante en cada muestra y, mediante una recta de calibrado previa, se interpola para conocer la concentración de gelatina en cada caso.

Para las microesferas control y cada condición de recubrimiento se realizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas. Se calculó la absorbancia media de cada réplica biológica, y con la curva de calibrado, se calculó la concentración de gelatina A ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada réplica biológica. Con ello, se calculó la concentración media de gelatina A y la desviación típica ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada condición de recubrimiento analizada [Tabla 3].

Tabla 3. Concentración de gelatina A ($\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenida por ensayo BCA para cada condición de recubrimiento estudiada.

	3L	3T	6L	6T
Réplica 1	340,83	345,00	381,67	564,17
Réplica 2	407,50	365,83	444,17	486,67
Réplica 3	393,33	201,67	661,67	455,00
Media	380,56 ± 35,12	304,17 ± 89,38	495,83 ± 146,98	501,94 ± 56,16

Para el análisis estadístico se ha utilizado el software GraphPad Prism 9. Se aplicó un test ANOVA para estudiar la significancia estadística comprobando la existencia o no de diferencias significativas al comparar la concentración de Gel A entre las condiciones de recubrimiento. Ninguna de las comparaciones resultó diferencial, por lo que se llevó a cabo un T-Test comparando condiciones por pares de forma individualizada. La comparación entre la condición de 3 bicapas sin entrecruzar y 3 entrecruzadas no fue diferencialmente significativa (p -valor = 0,24), tampoco lo fue entre 6 bicapas sin entrecruzar y 6 entrecruzadas (p -valor = 0,95), ni entre 3 bicapas sin entrecruzar y 6 sin entrecruzar (p -valor = 0,26). La única comparación que demostró una diferencia estadísticamente significativa con un p -valor = 0,03 fue entre la condición de microesferas con 3 bicapas entrecruzadas y 6 entrecruzadas [Figura 16].

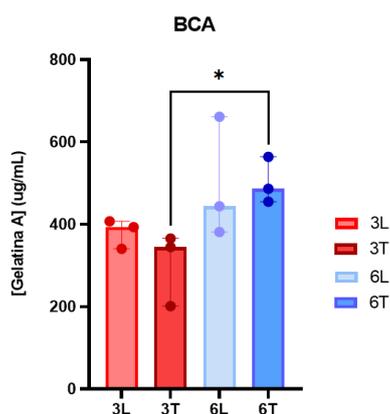


Figura 16. Concentración de gelatina A obtenidas por BCA para cada una de las condiciones de recubrimiento estudiadas. 3L, Microesferas con 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar. 3T, Microesferas con 3 bicapas GelA/HA entrecruzadas. 6L, Microesfera 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar. 6T Microesferas con 6 bicapas GelA/HA entrecruzadas. * Indica una significancia estadística asociada a un valor $p \leq 0,05$.

En cuanto a la no existencia de diferencias significativas entre microesferas con 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar y 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar puede explicarse por un posible efecto de saturación del recubrimiento. Al realizar el LBL sobre las microesferas la concentración de Gel A (y por consecuencia, la concentración de HA) debería aumentar conforme aumenta el número de bicapas depositadas. Sin embargo, parece que llega un punto en el recubrimiento se satura y a pesar de seguir depositando capas de polielectrolitos, la concentración de los mismos no aumenta linealmente con el número de capas, sino que lo hace más lentamente hasta llegar a la saturación del sistema. Por ello, la diferencia en cuanto a la concentración de gelatina A entre microesferas con el doble de bicapas no se corresponde con el doble de concentración, sino simplemente con una concentración más alta de gelatina A en las microesferas con mayor recubrimiento. El resultado concuerda con lo obtenido en el TGA donde se ve que la diferencia entre microesferas con 3 y 6 bicapas en relación a la fracción del peso del LBL respecto al peso total, es pequeña.

Entre las microesferas con el mismo número de bicapas, pero diferencia en la presencia o no de entrecruzamiento, es decir, entre 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar y entrecruzadas y entre 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar y entrecruzadas, tampoco se aprecian diferencias significativas en relación a la concentración de gelatina. Es el resultado esperado puesto que las condiciones comparadas en estos casos no se diferencian en el número de bicapas depositadas, y, por tanto, no deberían diferenciarse en cuanto a la concentración de gelatina. A pesar de poseer significancia estadística, cabe destacar una reducción considerable de la concentración gelatina A entre las microesferas con 3 bicapas sin entrecruzar y entrecruzadas. Este fenómeno podría explicarse debido a una pérdida de gelatina durante el entrecruzamiento por un exceso de manipulación o debido a la reducción de la disponibilidad de ciertos grupos por la formación de enlaces amida generando una menor señal y concentración aparente de gelatina.

La existencia de diferencias significativas en cuanto a la concentración de gelatina entre las microesferas con 3 bicapas entrecruzadas y 6 bicapas entrecruzadas es difícil de explicar sabiendo que no existen diferencias significativas entre las mismas condiciones sin entrecruzar y que el entrecruzamiento no debe afectar a la concentración de los polielectrolitos empleados. Se consideró que el entrecruzamiento de las bicapas permitía generar un recubrimiento más consistente y duradero con el que al comparar bicapas entrecruzadas se verían diferencias significativas en cuanto a la concentración de polielectrolitos. Sin embargo, en la tabla 3 se aprecia que la diferencia en cuanto a la concentración de gelatina entre las microesferas no entrecruzadas y entrecruzadas no es suficiente como para explicar este hecho. Otra opción para explicar la diferencia significativa entre a la concentración de gelatina A en microesferas con 3 bicapas entrecruzadas y con 6 bicapas entrecruzadas es que el entrecruzamiento permite generar microesferas más homogéneas de forma que pueden apreciarse diferencias significativas entre ellas, pero no entre microesferas sin entrecruzar. Al igual que en el caso anterior, en tabla 3 se desvanece esta idea puesto que todas las condiciones presentan resultados igual de variables con una desviación típica similar. Por tanto, las microesferas con 3 bicapas entrecruzadas y 6 bicapas entrecruzadas no deberían presentar diferencias significativas en cuanto a la concentración de gelatina si no lo hacen las microesferas con las mismas bicapas sin entrecruzar.

Como conclusiones del ensayo de BCA destacan: la presencia de gelatina A en los recubrimientos y, por tanto, la presencia también de ácido hialurónico (la Gel A no puede depositarse si antes no lo ha hecho un compuesto de carga opuesta, HA), el aumento de la concentración de polielectrolitos al aumentar el número de bicapas aunque de forma no lineal (la diferencia del Gel A entre 3 y 6 bicapas no se considera estadísticamente significativa, sin embargo, a nivel cuantitativo se aprecia que a mayor número de bicapas, mayor concentración de polielectrolitos hasta la saturación), y el mantenimiento de gelatina y ácido hialurónico tras el entrecruzamiento (a pesar de que sus concentraciones pueden variar durante el proceso).

Ensayos BCA en estudios anteriores para la cuantificación de proteínas como caracterización del recubrimiento con polielectrolitos han mostrado resultados similares. Clara-Trujillo et al. sintetizaron microesferas copoliméricas y con fibronectina absorbida en su superficie y cuantificaron la proteína adsorbida mediante un BCA (Clara-Trujillo et al., 2022). Por su parte, Marín-Payá et al. llevaron a cabo un recubrimiento de microesferas mediante colágeno/ácido hialurónico y cuantificaron el colágeno depositado con el mismo ensayo (Marín-Payá et al., 2021). Ambos demostrando que el contenido proteico aumentaba con la deposición de capas.

4.5 Ensayo de estabilidad

4.3.1 Evolución de las microesferas en medios de degradación hidrolítica y enzimática

El objetivo del ensayo de estabilidad es analizar si las microesferas control de alginato sin recubrimiento y las diferentes condiciones de microesferas recubiertas se mantienen íntegras en diferentes medios a diferentes tiempos o si por el contrario sufren un deterioro o ruptura durante los tiempos de ensayo, comprobando así la existencia o no de diferencias en cuanto a la estabilidad y degradación de las microesferas en función del número de bicapas de su recubrimiento y el grado de entrecruzamiento.

Para llevar a cabo el ensayo se coloca una muestra de cada una de las condiciones de microesferas estudiadas (control sin recubrimiento (C), con 3 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (3L), con 3 bicapas Gela/HA entrecruzadas (3T), con 6 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (6L) y con 6 bicapas Gela/HA entrecruzadas (6T)) en cada uno de los medios del ensayo: agua, medio de

cultivo RPMI 1640 y medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con colagenasa y hialuronidasa. El seguimiento de la evolución y la degradación de las microesferas se realiza visualizando las muestras en microscopio óptico invertido a tiempo 0 horas, 2 horas, 7 horas y 22 horas y tomando imágenes de todas las condiciones, en todos los medios y a todos los tiempos para su posterior análisis. En el apartado 3.6.1 se desarrolla el ensayo en detalle.

El análisis de las imágenes obtenidas se lleva a cabo mediante el software de análisis de imágenes ImageJ. Se midieron los diámetros mayores de 150 microesferas de cada condición en cada medio y tiempo, siempre que las microesferas permanecieran íntegras y permitieran su recuento, obteniéndose así el diámetro mayor medio y su desviación estándar para cada caso (las microesferas analizadas fueron seleccionadas arbitrariamente a partir de un número variado imágenes). A partir de los diámetros obtenidos se realizó un análisis estadístico empleando el software GraphPad Prism9 para estudiar la existencia o no de diferencias significativas en relación a la estabilidad de las microesferas según su recubrimiento.

En primer lugar, cabe destacar la no existencia de diferencias significativas entre los tiempo 0 y 2 horas para todas las condiciones y en todos los medios. Es decir, independientemente de la muestra analizada (microesferas control sin recubrimiento o microesferas recubiertas con diferentes bicapas y grado de entrecruzamiento) y del medio en el que se encuentren, no se aprecian diferencias significativas al comparar los diámetros medidos a tiempo 0 horas y a tiempo 2 horas. Empleando GraphPad Prism9 se comparó cada condición en cada medio a tiempo 0 horas y a tiempo 2 horas. Todas las comparaciones obtuvieron un p-valor superior a 0,05, por lo que se considera que entre tiempo 0 y 2 horas no hay diferencias significativas en ningún caso. Por esta razón en las figuras y conclusiones de este apartado no se tendrá en cuenta el tiempo 2 horas ya que al no presentar diferencias significativas con respecto el tiempo 0 horas, se pueden aplicar las mismas conclusiones y únicamente este último se tendrá en cuenta. No obstante, todas las imágenes tomadas y todos los datos de los diámetros obtenidos de todas las condiciones a todos los tiempos, en todos los medios y se muestran en el Anexo II.

Del mismo modo, se ha comprobado la no existencia de diferencias significativas entre las condiciones no entrecruzadas y entrecruzadas para cada número de bicapas estudiado. Se han comparado las microesferas con 3 bicapas de Gel/HA sin entrecruzar (3L) y entrecruzadas (3T) para cada uno de los medios y para cada uno de los tiempos, sin encontrar diferencias significativas entre ellas, y al igual ocurre al comparar entre 6 bicapas de Gel/HA sin entrecruzar (6L) y entrecruzadas (6T) para cada medio y cada tiempo. El estudio estadístico se realizó de la misma manera que el anterior. Todas las comparaciones obtuvieron un p-valor superior a 0,05, indicando la no existencia de diferencias significativas. Únicamente existe una diferencia significativa en la comparación entre 3L y 3T en medio RPMI a tiempo 7 horas (p -valor=0,004), pero dado que el resto de las comparaciones, tanto con 3 como con 6 bicapas, no muestran diferencias significativas, no se tendrá en cuenta. Siguiendo la línea de lo ocurrido con el tiempo 2 horas, las condiciones entrecruzadas (3 bicapas entrecruzadas (3T) y 6 bicapas entrecruzadas (6T)) no van a comentarse en las figuras y resultados analizados en este apartado puesto que, al no presentar diferencias significativas respecto las condiciones sin entrecruzamiento, las conclusiones extraídas serán las mismas en ambos casos. No obstante, todas las imágenes tomadas y los datos de los diámetros obtenidos se muestran en el Anexo II.

En relación a las imágenes obtenidas cabe destacar ciertos aspectos clave para cada condición estudiada (C, 3L y 6L) que luego serán desarrollados tras realizar el análisis estadístico. Respecto a las microesferas control sin recubrimiento (C), se observa cómo en agua se mantienen íntegras durante todos los tiempos de ensayo. En cambio, tanto en el medio RPMI, como en RPMI suplementado con enzimas, a las 7 horas se ve un gran aumento del tamaño medio de las microesferas, y a las 22 horas las microesferas se han desintegrado por completo [Figura 17].

MICROESFERAS CONTROL

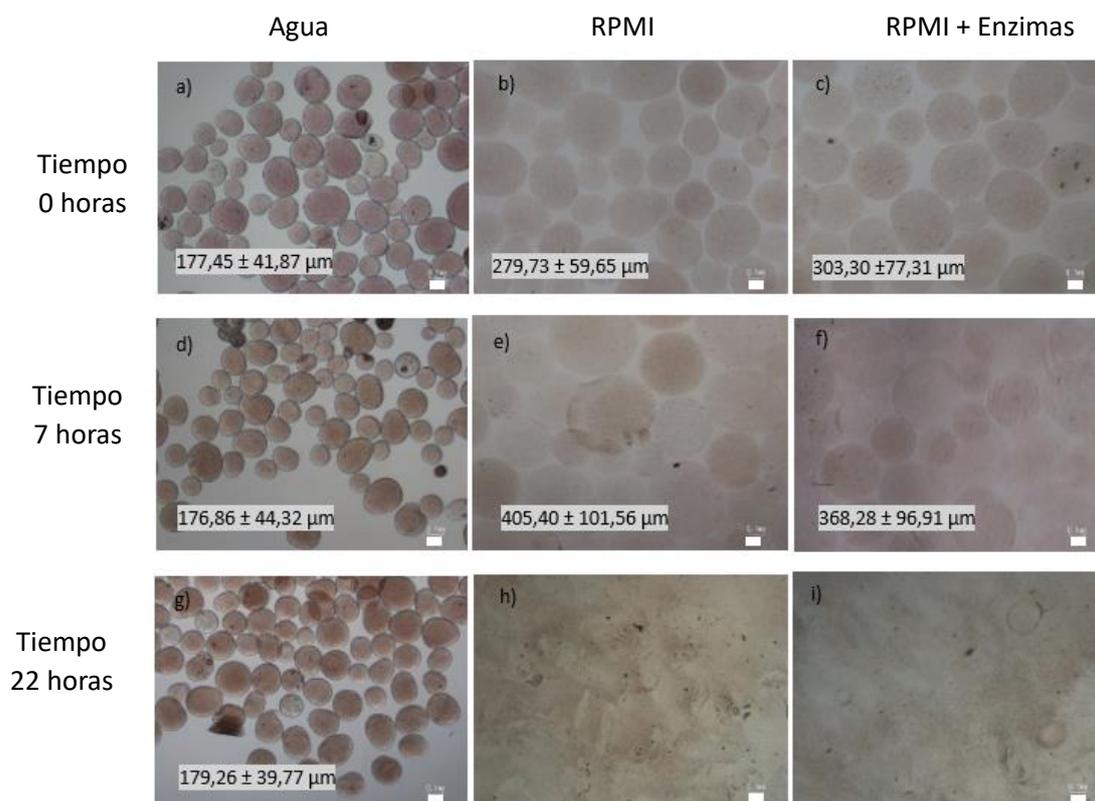


Figura 17. Microesferas de alginato sin recubrimiento a tiempo 0 horas en agua (a), RPMI (b) y RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa (c), a 7 horas en agua (d), RPMI (e) y RPMI suplementado (f) y a 22 horas en agua (g), RPMI (h) y RPMI suplementado (i). Escala de 100μm a-i. Media y desviación estándar para 150 microesferas.

Al comparar las microesferas control sin recubrimiento (C) con las microesferas recubiertas por 3 bicapas de GELA/HA sin entrecruzar (3L) y las microesferas recubiertas con 6 bicapas de GELA/HA sin entrecruzar (6L) a tiempo 0 horas [Figura 18], 7 horas [Figura 19] y 22 horas [Figura 20] en cada uno de los medios, se observan diferencias. Independientemente del tiempo analizado en agua no aparecen diferencias relevantes entre microesferas control y con recubrimiento, y se mantienen íntegras durante todo el ensayo. En cambio, en medio RPMI y RPMI suplementado con enzimas, a tiempo 0 horas las microesferas con recubrimiento presentan un tamaño medio menor que las microesferas control [Figura 18]. A tiempo 7 horas las microesferas recubiertas presentan también un tamaño medio menor y más similar a su tamaño inicial en comparación con las microesferas control sin recubrimiento (se hinchan menos), especialmente las microesferas 6L [Figura 19]. Por último, a tiempo 22 horas, mientras que las microesferas control están completamente desintegradas, parte de las microesferas recubiertas logran mantener su integridad. Destaca como las microesferas 6L se mantiene íntegras en mayor proporción que las 3L [Figura 20].

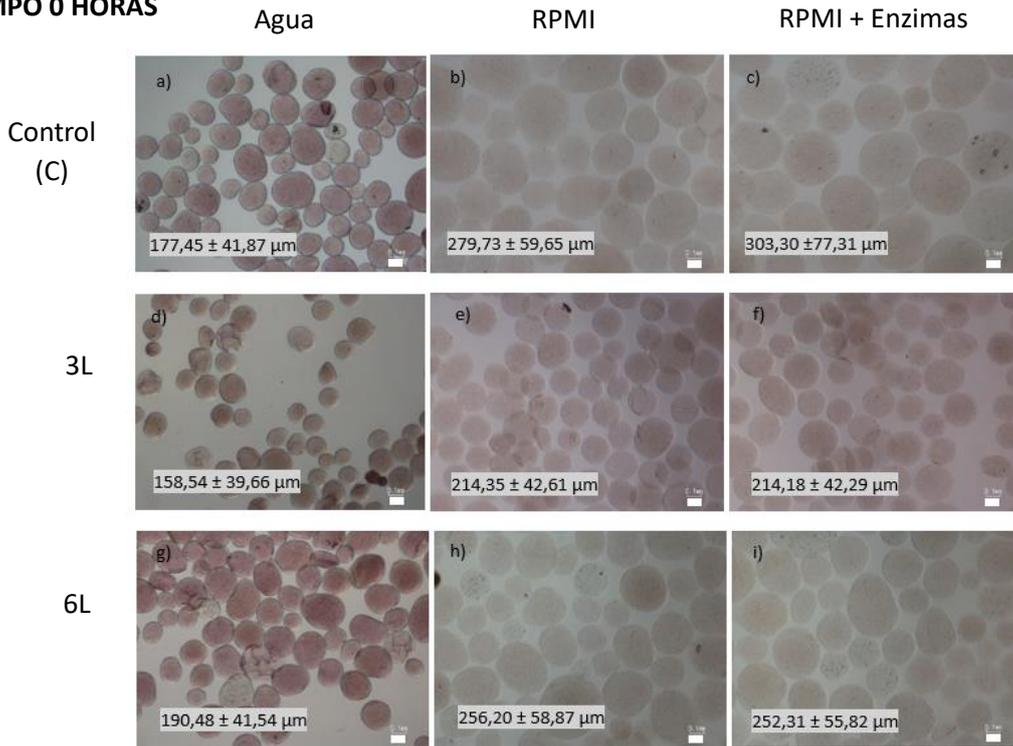
TIEMPO 0 HORAS

Figura 18. Microesferas a tiempo 0 horas. Microesferas control sin recubrimiento (C) en agua (a), RPMI (b) y RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa (c). Microesferas con tres bicpas Gela/HA sin entrecruzar (3L) en agua (d), RPMI (e) y RPMI suplementado (f). Microesferas con seis bicpas Gela/HA sin entrecruzar (6L) en agua (g), RPMI (h) y RPMI suplementado (i). Escala de 100µm a-i. Media y desviación estándar para 150 microesferas.

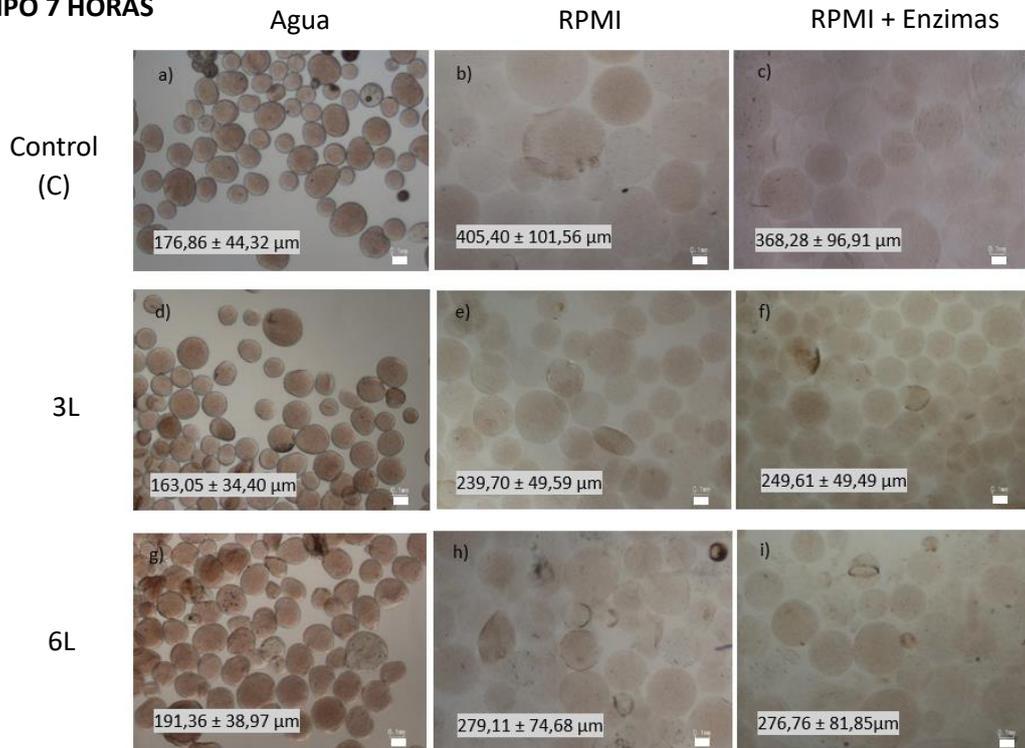
TIEMPO 7 HORAS

Figura 19. Microesferas a tiempo 7 horas. Microesferas control sin recubrimiento (C) en agua (a), RPMI (b) y RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa (c). Microesferas con tres bicpas Gela/HA sin entrecruzar (3L) en agua (d), RPMI (e) y RPMI suplementado (f). Microesferas con seis bicpas Gela/HA sin entrecruzar (6L) en agua (g), RPMI (h) y RPMI suplementado (i). Escala de 100µm a-i. Media y desviación estándar para 150 microesferas.

TIEMPO 22 HORAS

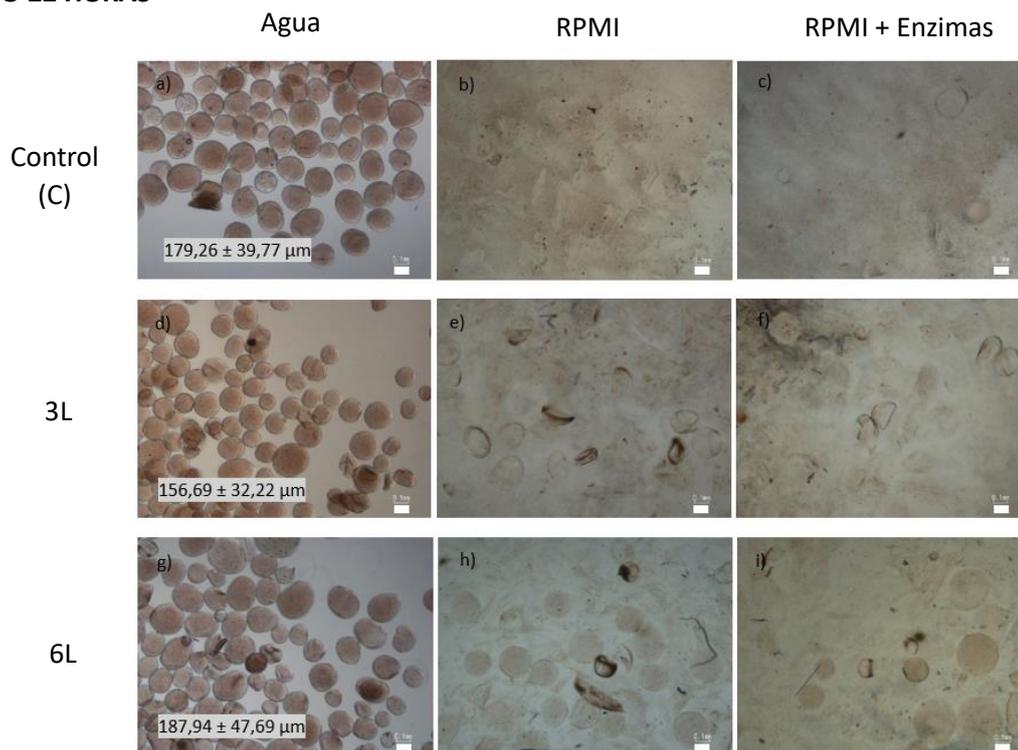


Figura 20. Microesferas a tiempo 22 horas. Microesferas control sin recubrimiento (C) en agua (a), RPMI (b) y RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa (c). Microesferas con tres bicapas Gela/HA sin entrecruzar (3L) en agua (d), RPMI (e) y RPMI suplementado (f). Microesferas con seis bicapas Gela/HA sin entrecruzar (6L) en agua (g), RPMI (h) y RPMI suplementado (i). Escala de 100 μ m a-i. Media y desviación estándar para 150 microesferas.

Comentados los aspectos y diferencias más relevantes teniendo en cuenta las imágenes obtenidas y los tamaños de las microesferas en cada condición, medio y tiempo, se analizan los resultados de los análisis estadísticos restantes para conocer si aparecen o no diferencias significativas entre las condiciones estudiadas.

Para empezar, no se han encontrado diferencias significativas al comparar cada condición de microesferas en agua a diferentes tiempos. Con respecto a las microesferas control (C) se han comparado los valores de sus diámetros en agua a tiempo 0, 2, 7 y 22 horas. Todas las comparaciones obtuvieron un p-valor muy superior a 0,05, comprobando la no existencia de diferencias significativas. El mismo procedimiento fue realizado para las microesferas con recubrimiento de 3 bicapas (3L) y 6 bicapas (6L) obteniendo el mismo resultado. Por tanto, para cada condición estudiada (C, 3L y 6L) la integridad de las microesferas se mantiene en agua durante todos los tiempos de estudio, considerándose estables sin variaciones en su forma ni su tamaño. Así pues, todos los tipos de microesfera son susceptibles de ser almacenados en agua sin comprometer la integridad de las mismas.

Al comparar entre los distintos medios es evidente que, mientras que en agua ningún tipo de microesferas muestra diferencias entre los tiempos estudiados, tanto en medio RPMI con o sin enzimas, se observa un cambio en el comportamiento de las microesferas, que van aumentando su tamaño conforme avanza el tiempo hasta deshacerse a diferentes ritmos según el recubrimiento que poseen. Hay dos fenómenos que pueden explicar el hecho de que las microesferas aumenten su tamaño en medio RPMI: la entrada de agua a la microesfera y la salida de calcio de su interior. La entrada de agua a la microesfera podría explicarse debido a que el medio RPMI contiene una alta concentración de iones, es decir, es medio de fuerza iónica

elevada, lo que da lugar a una distribución desigual de los mismos entre las microesferas y el medio generando un movimiento de cargas inestable que provoca una reducción de repulsión electrostática entre las cadenas de alginato de carga negativa que conforman la microesfera. De este modo se genera un equilibrio osmótico desfavorable con una diferencia de osmolaridad acentuada entre la microesfera y el medio RPMI que resulta en una mayor absorción de agua por parte de la microesfera de alginato y en su hinchamiento. Además, el medio RPMI contiene otros solutos y componentes orgánicos que pueden alterar la estructura del hidrogel que conforma las microesferas aumentando su capacidad de absorber agua por hinchamiento. Por otro lado, la salida del calcio del interior de las microesferas está relacionada con el potencial químico del calcio y su actividad iónica en diferentes medios. En un medio salino como el RPMI, el calcio tiene una potencial químico y una actividad iónica mayor que en el agua, lo que conlleva una mayor migración de los iones calcio hacia el medio exterior perdiendo así los puntos de entrecruzamiento iónico reversible entre las cadenas de alginato del interior de la microesfera. De este modo las moléculas de alginato, que además son hidrófilas, quedan libres, con mayor movimiento, y permiten una mayor entrada de agua a la microesfera (hinchamiento).

Otro de los puntos importantes que debe analizarse del ensayo de estabilidad es como en medio RPMI y en medio RPMI suplementado con enzimas, a tiempo 0 horas las microesferas control sin recubrimiento presentan ya un tamaño medio mayor que las microesferas recubiertas, y a tiempo 7 horas aumentan su tamaño de mucho más en comparación con su tamaño inicial a lo que lo hacen las microesferas recubiertas tanto con 3 bicapas como con 6 bicapas [Tabla 4].

Tabla 4. Comparación de diámetros de las microesferas en el ensayo de estabilidad. Microesferas control, con 3 bicapas (3L) y con 6 bicapas (6L), a tiempo 0 horas y 7 horas en medio RPMI y medio RPMI suplementado con enzimas (RPMI + Enz). Diámetro mayor medio \pm Desviación estándar. Unidad de medida: μm .

	CONTROL		3L		6L	
	RPMI	RPMI + Enz	RPMI	RPMI + Enz	RPMI	RPMI + Enz
0 HORAS	279,72 \pm 59,65	303,3 \pm 77,31	214,35 \pm 42,61	214,18 \pm 42,29	256,20 \pm 58,87	252,31 \pm 55,82
7 HORAS	405,40 \pm 101,56	368,28 \pm 96,91	239,70 \pm 49,59	249,61 \pm 49	279,11 \pm 74,68	276,76 \pm 81,85

Para demostrar que tanto en RPMI y como en RPMI suplementado con enzimas a tiempo 0 horas las microesferas control son significativamente de mayor tamaño y que, a tiempo 7 horas las microesferas recubiertas con 3 o 6 bicapas son significativamente más pequeñas ya que aumentan mucho menos su tamaño en comparación con su tamaño inicial que en el caso de las microesferas control, se lleva a cabo un análisis estadístico. En este caso se compara para cada tiempo (0 horas y 7 horas) y para cada medio (RPMI y RPMI suplementado con enzimas) la condición control frente a 3 bicapas (3L) y la condición control frente a 6 bicapas (6L). Todas las comparaciones obtuvieron un p-valor menor a 0,0001 (excepto la en la comparación de microesferas control frente a 6 bicapas en RPMI a 0 horas que obtuvo un p-valor también significativo de 0,073), comprobando la existencia de diferencias significativas entre las condiciones comparadas [Figura 21].

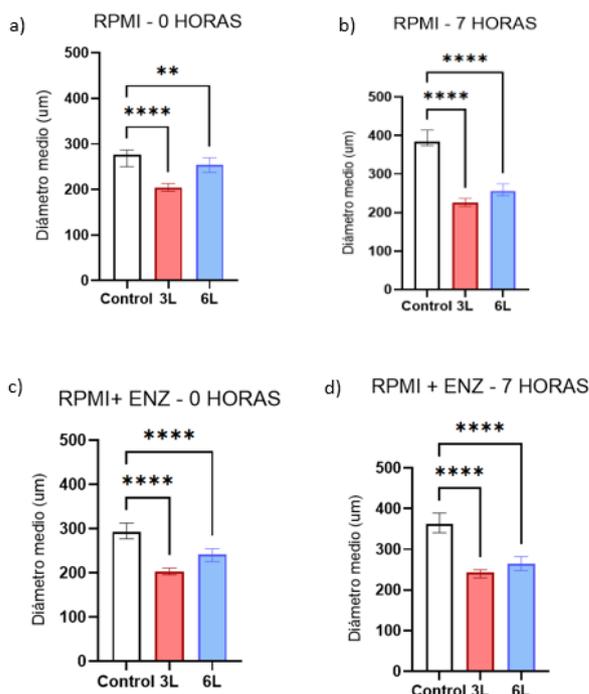


Figura 21. Análisis estadístico de la comparación de entre microesferas control sin recubrimiento (Control) y microesferas con recubrimiento de 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (3L), y entre microesferas control sin recubrimiento (Control) y microesferas con recubrimiento de 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (6L), en RPMI a tiempo 0 horas (a), RPMI a tiempo 7 horas (b), RPMI suplementado con enzimas (RPMI + Enz) a tiempo 0 horas (c) y RPMI suplementado con enzimas (RPMI + Enz) a tiempo 7 horas (d). ** Indica una significancia estadística asociada a un p-valor entre 0.01 y 0.001. **** Indica una significancia estadística asociada a un p-valor < 0,0001.

Dado que sí existen diferencias significativas en cuanto al tamaño de las microesferas sin recubrimiento respecto a las microesferas recubiertas (tanto con 3 bicapas como con 6 bicapas) tanto a tiempo 0 como a tiempo 7 y tanto en RPMI como en RPMI suplementado con enzimas, puede concluirse que las microesferas recubiertas se hinchan en menor medida que las microesferas control en un medio diferente al agua. Esto puede ser debido a que el recubrimiento de GelA/HA retiene el hinchamiento, por ello las microesferas recubiertas se mantienen más pequeñas y aumentan menos su tamaño en comparación con su tamaño inicial que las microesferas sin recubrimiento. Por tanto, las bicapas de GelA/HA depositadas sobre las microesferas crean una cubierta íntegra y consistente que permite soportar la presión que ejercen las microesferas desde su interior cuando se hinchan, siendo una forma de resistencia frente al fenómeno de absorción de agua e hinchamiento.

En cuanto al tiempo 22 horas en agua, como se ha comentado anteriormente, todas las condiciones de microesferas permanecen íntegras y sin cambios respecto al inicio. En cambio, a tiempo 22 horas en medio RPMI y PRMI suplementado con enzimas sí se aprecian diferencias entre las condiciones estudiadas (C, 3L, 6L). En ambos medios a este tiempo la mayor parte de las microesferas han estallado y están desintegradas por lo que no han podido medirse diámetros ni realizar análisis estadísticos. Además, tampoco se ha podido realizar un recuento de las microesferas rotas con respecto a las microesferas iniciales puesto que las imágenes permiten observar los restos de las microesferas que confirman su ruptura, pero no saber de cuántas microesferas provienen. La comparación puede realizarse a través de las imágenes obtenidas que muestran cómo a 22 horas, tanto en medio RPMI original como en el suplementado con enzimas, se observan diferencias claras entre las distintas microesferas. Las microesferas control sin recubrir han estallado y están completamente desintegradas. Las microesferas con recubrimiento de 3 bicapas GelA/HA (3L) son más resistentes puesto que, a pesar de no encontrar microesferas íntegras, se observan más restos que en el caso de las microesferas control y, además, se aprecian formas esféricas indicando que una fase inicial de degradación. Las microesferas con recubrimiento de 6 bicapas GelA/HA (6L) muestran una mayor estabilidad y resistencia en comparación con las dos anteriores puesto que, a pesar de

encontrarse restos de microesferas degradadas, se aprecian todavía microesferas completamente íntegras. Con estos resultados puede considerarse que el recubrimiento no solo protege a las microesferas de su hinchamiento, sino que, a mayor número de bicapas mayor estabilidad presentan las microesferas a tiempos largos en medios diferentes al agua.

En relación a la degradación de las microesferas cabe destacar que, llegado un cierto momento temporal para cada una de las condiciones estudiadas en función de su recubrimiento, tiene lugar una ruptura total de la microesfera. Este hecho resulta apropiado para conseguir en futuros estudios una liberación simultánea y homogénea de todos los componentes cargados en las microesferas independiente de su tamaño, y así superar la liberación sesgada por tamaño asociada a la difusión. Esto es especialmente importante cuando se trata de liberar un conjunto de moléculas con un rango de tamaños muy amplio como es el caso del secretoma.

Por último, se comprueba el comportamiento de las microesferas en el medio RPMI y en medio RPMI suplementado con enzimas. Se realizaron análisis estadísticos comparando los diámetros obtenidos en RPMI sin y con enzimas para cada condición de microesferas (C, 3L y 6L) a tiempo 0 y a tiempo 7. Las microesferas control no poseen recubrimiento de Gela/HA y no deberían verse afectadas por la presencia de enzimas, por lo que pueden obviarse en este punto. En el caso de las microesferas 3L a 0 horas, no se encontró una diferencia significativa entre RPMI y RPMI con enzimas (p -valor = 0,9812), sin embargo, sí hubo una diferencia significativa a 7 horas (p -valor = 0,0088). No podría considerarse pues una conclusión cerrada. Para las microesferas 6L a 0 horas, no se encontró una diferencia significativa entre RPMI y RPMI con enzimas (p -valor = 0,2254), y tampoco a 7 horas (p -valor = 0,9760). Por tanto, podría considerarse de forma genérica que no existen diferencias significativas en el comportamiento de las microesferas recubiertas de Gela/HA entre un medio RPMI sin y con tratamiento enzimático, concluyendo así que la presencia de enzimas no acelera la degradación de las microesferas. Por lo general, la degradación hidrolítica de un biomaterial es mucho más reproducible que la degradación enzimática, que depende del tipo de enzimas presentes en el tejido donde se aplique el biomaterial, de su concentración y del grado de actividad de las mismas. Las microesferas estudiadas con recubrimiento de Gela/HA no presentan diferencias significativas entre una degradación hidrolítica y enzimática, lo que supone una ventaja puesto que el mecanismo de degradación será gobernado por la hidrólisis, siendo mucho más reproducible que la degradación enzimática.

4.3.2 Obtención de microcápsulas por licuado del núcleo de alginato

Para la obtención de microcápsulas se debe licuar el núcleo interior de la microesfera de alginato tras la realización del LBL de modo que el recubrimiento generado mantenga la integridad de la esfera formada una microcápsula hueca. En este proceso se emplea EDTA, un quelante del calcio que al secuestrar el ion deshace el entrecruzamiento reversible entre las cadenas de alginato de las microesferas, de forma que su interior pasa a estar licuado. En este trabajo, el recubrimiento de Gela/HA es el responsable de mantener las microesferas íntegras tras el tratamiento con EDTA para el licuado del alginato y la formación de microcápsulas huecas como futuros vehículos de encapsulación y liberación de compuestos bioactivos. Para conocer su resistencia y analizar su comportamiento se trataron las microesferas recubiertas con 6 bicapas de Gel A/HA entrecruzadas con EDTA. El resultado se visualizó bajo el microscopio óptico y se tomaron imágenes de lo observado. A pesar de ser la condición de microesferas recubiertas con mayor resistencia aparente, por ser las de mayor número de bicapas con entrecruzamiento de las mismas, las microesferas estudiadas no aguantaron la acción de EDTA ya que perdieron su integridad deshaciéndose de forma prácticamente instantánea [Figura 22].

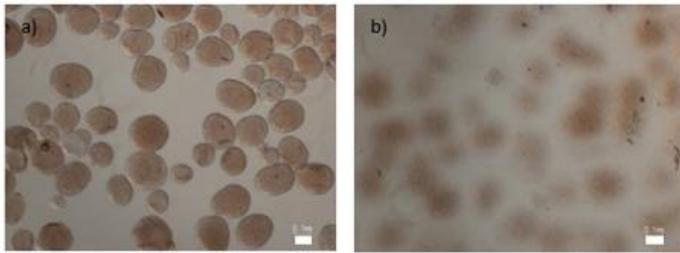


Figura 22. a) Microesferas con recubrimiento de 6 bicapas de gelatina A y ácido hialurónico entrecruzadas en agua. b) Microesferas de la figura a) tras la adición de EDTA. Escala: 100 μ m en ambos casos.

El hecho de que las microesferas con 6 bicapas entrecruzadas se deshagan al contacto con EDTA resulta inusual puesto que el recubrimiento sobre las microesferas les debería permitir mantenerse íntegras como demostraron García-Briega et al., quienes sintetizaron microesferas con recubrimiento de tres bicapas quitosano/heparina entrecruzadas y de dos bicapas de polilisina/alginate sin entrecruzar, y resistieron en EDTA hasta día 14 (García-Briega et al., 2022).

Tras analizar el resultado obtenido, podría considerarse que el recubrimiento Gel A/HA no es compacto, por ello las microesferas se disuelven al introducirse en EDTA. Pero teniendo en cuenta el resultado del ensayo de estabilidad, no puede afirmarse que el recubrimiento con Gela/HA sea poco consistente ya que, en ese caso, no retendría el hinchamiento de las microesferas y sí lo hace. Por tanto, este recubrimiento es coherente y consistente, pero al introducir las microesferas en EDTA se disuelven y desaparecen. Este fenómeno no está relacionado con la falta de resistencia del recubrimiento, sino que es posible que el EDTA no solo licue el alginato interior de la microesfera, sino que también actúe sobre el recubrimiento de Gela/HA degradándolo y explicando así por qué las microesferas recubiertas con este par no resisten la acción del EDTA. Si se quieren sintetizar microcápsulas de Gel A/HA por licuado de alginato interior de las microesferas deberá utilizarse una vía alternativa al EDTA.

4.4 Doble emulsión

4.4.1 Partículas de PLLA. Dispersión de tamaños. Emulsión O/W

Se obtuvieron partículas de PLLA mediante una emulsión simple aceite en agua (O/W). PLLA disuelto en diclorometano se goteó sobre PVA acuoso en agitación para formar la emulsión, tras la evaporación del disolvente las gotas precipitaron para formar las partículas sólidas. Todo el proceso ha sido detallado en el apartado 3.7.1. Las partículas obtenidas fueron visualizadas al microscopio óptico y tomando imágenes para el análisis de tamaños que se procesaron con ImageJ. Se intentó aplicar la herramienta “Threshold” para conocer los parámetros característicos de las partículas, sin embargo, no eran bien detectadas y se decidió estudiar su diámetro como parámetro base el análisis de tamaños. Fueron analizadas 450 partículas de PLLA [Figura 23].

Los datos obtenidos fueron analizados con el software de análisis estadístico GraphPad Prism 9. Tras aplicar el método ROUT (Q = 5%) no se detectaron valores anómalos, de modo que se trabajó con las medidas iniciales de las 250 partículas. Se calcularon los estadísticos descriptivos oportunos [Tabla 5] y se llevó a cabo un histograma para conocer la dispersión de tamaños de las partículas sintetizadas [Figura 23] ajustando los rangos de los intervalos a 0,5 μ m.

Tabla 5. Diámetro de las micropartículas de PLLA. Las imágenes fueron analizadas mediante ImageJ obteniendo los datos numéricos. La estadística asociada se realizó mediante GraphPad Prism 9

Muestra	N total	Media (μ m)	Desviación estándar (μ m)	Mediana (μ m)
Partículas PLLA	450	3,2	1,0	3,1

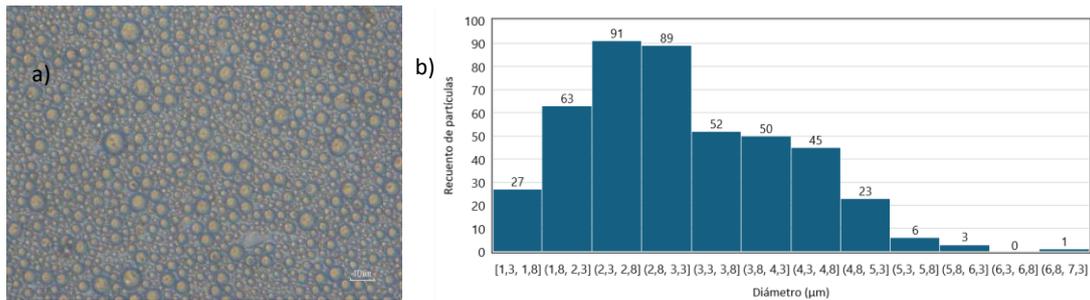


Figura 23. Micropartículas de PLLA a) Visualización al microscopio óptico. Escala: 10μm. b) Histograma de los diámetros de las partículas analizadas.

El diámetro medio de las partículas de PLLA sintetizadas es de $3,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$. El protocolo diseñado en este trabajo pretendía conseguir nanopartículas de PLLA, sin embargo, no pueden considerarse nanopartículas puesto que no son de rango nanométrico sino micrométrico. Al comparar el resultado obtenido con literatura anterior sobre síntesis de partículas de PLLA por el mismo método u otros similares, los tamaños obtenidos son de $165 \pm 12 \text{nm}$ (Pavot et al., 2013), $102 \pm 18 \text{nm}$ (Leo et al., 2004) y $211 \pm 28 \text{nm}$ (Varga et al., 2019). Por tanto, el tamaño medio de partícula esperado era mucho más pequeño en comparación con el resultado obtenido. En cuanto a la dispersión de tamaños, un 54%, de las partículas presenta un rango de tamaño de entre 1,8 y 3,3μm de diámetro, tamaños mayores de lo deseado y estando en este rango la media de la población estudiada. Cabe destacar que un 33% de partículas analizadas posee un tamaño medio aún mayor de entre 3,4 y 4,83μm de diámetro. Por tanto, la dispersión de tamaños refuerza la idea de que el tamaño de partícula obtenido es mayor del esperado.

Obtener partículas de PLLA de pocas micras de tamaño no parece suponer un problema a la hora de introducirlas posteriormente en las microesferas de alginato sintetizadas por microfluidica, puesto que éstas tienen un tamaño mayor. Sin embargo, sí puede suponer un problema en cuanto al proceso técnico síntesis puesto que, al ser partículas de tamaño relativamente grande, existe el riesgo de formar agregados con facilidad una vez disueltas en la disolución de alginato o de colapsar los capilares del sistema de microfluidica. Una posible opción para reducir el tamaño de las partículas de PLLA obtenidas de forma simple es aumentar la velocidad de trabajo del Ultra-Turrax, esperando obtener así partículas de menor tamaño.

4.4.2 Encapsulación de un compuesto soluble. Emulsión W/O

Una vez obtenidas partículas de PLLA, se intentó encapsular en ellas una disolución acuosa de un compuesto de interés soluble en agua, la rodamina. En primer lugar, debía obtenerse por emulsión simple W/O un continuo polimérico de PLLA con pequeñas gotas acuosas y estables, que sería utilizado para llevar a cabo una segunda emulsión W/O/W y obtener así partículas de PLLA cargadas con rodamina. Para la obtención de una primera emulsión W/O estable se llevaron a cabo varios intentos, pero ninguno resultó ser exitoso. Todos los procesos han sido detallados en el apartado 3.7.2.

En primer lugar, se llevó a cabo la emulsión de un disolución acuosa de rodamina en una disolución de PLLA y Span85 en diclorometano en el Ultra-Turrax. El resultado obtenido tras detener la agitación fue una rápida separación de ambas fases generando gotas de gran tamaño y dando lugar a una emulsión inestable [Figura 24].



Figura 24. Resultado fallido de la emulsión en Ultra-Turrax (8 minutos a 10.000 rpm) de una disolución acuosa de rodamina a 1mg/mL sobre una disolución orgánica de PLLA y Span85 en diclorometano.

Tras el resultado obtenido se repitió el proceso llevando a cabo una serie de modificaciones en relación a los surfactantes, volúmenes, velocidades de agitación y temperatura de trabajo. Se realizó la emulsión de una disolución acuosa de rodamina y Tween20 en un disolución de PLLA y Span85 en diclorometano en el Ultra-Turrax en un baño hielo. A pesar de las modificaciones, la emulsión obtenida era inestable [Figura 25].

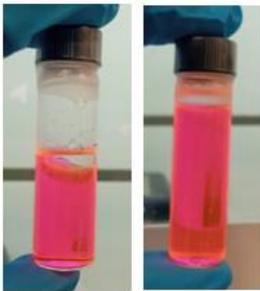


Figura 25. Resultado fallido de la emulsión en Ultra-Turrax (15 minutos a 15.800 rpm) y baño de hielo, de una disolución acuosa de Tween20 y rodamina a 1mg/mL sobre una disolución orgánica de PLLA y Span85 en diclorometano.

Por último, se llevó a cabo un protocolo similar cambiando el equipo de trabajo por un homogeneizadores ultrasónico, y el par de surfactantes empleados por Span80 y Tween80. La emulsión obtenida tras este proceso parecía mantenerse estable durante los primeros instantes, pero posteriormente las fases acabaron por separarse [Figura 26].

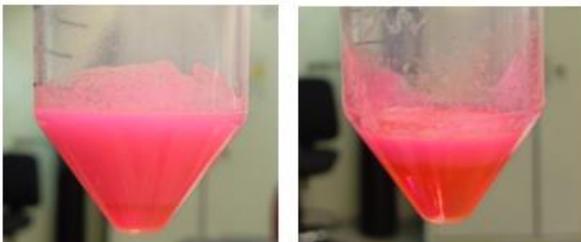


Figura 26. Resultado fallido de la emulsión en el ultrasonidos a amplitud 60% y baño de hielo, de una disolución acuosa de Tween80 y rodamina a 1mg/mL sobre una disolución orgánica de PLLA y Span80 en diclorometano.

Estudios anteriores centrados en la encapsulación de componentes bioactivos solubles mediante doble emulsión demuestran la dificultad de obtener una primera emulsión estable. Una de las dificultades en cuanto a la estabilidad de la primera emulsión es el adelgazamiento de la película que contiene las gotas acuosas estables, íntegras y diferenciadas, lo que conlleva la fusión de las gotas dando lugar a gotas de mayor tamaño que acaban por romperse provocando la separación de las fases (Faridi Esfanjani et al., 2017). Otra de las dificultades es la transferencia de la fase acuosa contenida en las gotas hacia la fase oleosa debido a una diferencia de concentración de solutos que acaba en inestabilidad y separación de ambas fases (Ding et al., 2019).

Uno de los aspectos más complejos de una doble emulsión para la encapsulación de un compuesto soluble es la optimización de las variables implicadas en el proceso. En el este trabajo, se ha logrado la segunda parte de la emulsión correspondiente a la formación de partículas poliméricas por emulsión O/W. Sin embargo, la primera emulsión W/O de la disolución acuosa que se quiere encapsular sobre un continuo polimérico no se ha estabilizado. Se plantean para el futuro una serie de modificaciones centradas en el uso de surfactantes combinados y en el cambio densidades y viscosidades de ambas fases, para generar una primera emulsión estable.

En cuanto al uso de surfactantes, será necesario ajustar la cantidad total de surfactantes requerida respecto al volumen total de emulsión. Varios artículos sitúan esta cantidad en un 6-8% p/v (M.-G. Song et al., 2002), (Zhu et al., 2006). Posteriormente se debe diseñar una combinación de surfactantes, con un porcentaje relativo específico para cada uno, de modo que se obtenga un valor HLB (equilibrio lipofílico hidrofílico) óptimo para asegurar la estabilidad de la emulsión.

En relación a la variación de las densidades y viscosidades se diferencian varios puntos de abordaje. Una opción es el aumento de la densidad de la fase acuosa que quiere encapsularse disolviendo en ella un compuesto adicional como el ácido hialurónico, dextrano o alginato, o cambiado la molécula soluble disuelta en ella por otra de mayor peso molecular. De este modo, al aumentar a la densidad de la fase acuosa, ambas fases (acuosa y orgánica) presentarían una densidad y similar, lo que ralentizaría el fenómeno de separación entre ellas. Otra opción también interesante es el aumento de la viscosidad de la fase orgánica aumentando el porcentaje de polímero disuelto, de modo que las gotas de la disolución acuosa de interés se muevan más lento por el continuo polimérico, tardando más en fusionarse y retrasando la separación entre fases. En cuanto al cambio de densidad de la fase orgánica para obtener un valor más similar al de la fase acuosa favoreciendo la no separación entre fases, se plantea el uso de disolventes orgánicos distintos al diclorometano o una mezcla de ellos, y de polímeros biodegradables de pesos moleculares más pequeños que permitan su disolución en el disolvente orgánico seleccionado y la variación de su concentración para el estudio de condiciones diversas.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo final de grado uno de los objetivos planteados fue el desarrollo de microcápsulas de gelatina y ácido hialurónico por recubrimiento LBL de microesferas de alginato y el estudio su degradación en función del número de capas y su entrecruzamiento químico. Las conclusiones extraídas en este contexto son:

- La producción de microesferas de alginato mediante microfluídica es un sistema óptimo para la obtención las mismas, generando microesferas de diámetro medio de 155 μ m.
- La funcionalización de las microesferas por ensamblado capa por capa (LBL) de gelatina y ácido hialurónico genera un recubrimiento consistente en base a bicapas alternas de los polielectrolitos empleados.
- La estabilidad de las microesferas en diferentes medios varía en función de la presencia de recubrimiento, el número de bicapas que lo conforman y su entrecruzamiento químico. En agua todas las condiciones de microesferas se mantienen íntegras independientemente del tiempo transcurrido y la presencia de recubrimiento. En medio de cultivo, a mayor número de bicapas establecidas en el recubrimiento, mayor resistencia al hinchamiento y retraso en la ruptura completa de las microesferas.
- El recubrimiento GelA/HA no permite el licuado del núcleo interior alginato mediante EDTA para la obtención de microcápsulas.

Otros de los objetivos planteados fueron la síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico y el encapsulado en su interior de un compuesto hidrosoluble por doble emulsión. Con respecto a este proceso las conclusiones obtenidas son:

- Una emulsión simple O/W de una disolución de PLLA en un disolvente orgánico sobre una disolución acuosa homogeneizada en el Ultra-Turrax permite la obtención de partículas de PLLA. Para la obtención de partículas de tamaño nanométrico y no micrométrico se requiere ajustar las condiciones de trabajo.
- La encapsulación de un producto soluble en las partículas poliméricas presenta dificultades en cuanto a la obtención de una primera emulsión W/O estable (continuo polimérico de PLLA con nanogotas monodispersas de la disolución acuosa de interés).

Puede concluirse que el estudio desarrollado en ese trabajo final de grado y los resultados obtenidos aportan información valiosa contribuyendo de manera significativa al objetivo final del encapsulado del secretoma de células madre mesenquimales en microcápsulas. Para ello el secretoma soluble en agua sería encapsulado en nanopartículas de PLLA que posteriormente serían introducidas en el interior de las microesferas de alginato, las cuales serían funcionalizadas empleando los polielectrolitos deseados. El núcleo de alginato sería licuado obteniendo microcápsulas con nanopartículas de PLLA, cargadas de secretoma, en su interior. En presencia de agua, las microcápsulas la internalizan permitiendo la degradación hidrolítica de las nanopartículas de PLLA y la liberación del secretoma contenido en ellas, quedando el secretoma disuelto en las microcápsulas. De este modo, serían empleadas como vehículo de liberación del secretoma en nuevas plataformas de cultivo desarrolladas que permitan una mejor recreación del entorno tumoral de la médula ósea en mieloma múltiple.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic acid: Redefining its role. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7, pp. 1–19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>
- Alyafeeu, Y. A., Alaamery, M., Bawazeer, S., Almutairi, M. S., Alghamdi, B., Alomran, N., Sheereen, A., Daghestani, M., & Massadeh, S. (2018). Preparation of anastrozole loaded PEG-PLA nanoparticles: Evaluation of apoptotic response of breast cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 199–208. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151139>
- Arifka, M., Wilar, G., Elamin, K. M., & Wathoni, N. (2022). Polymeric Hydrogels as Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivery System in Biomedical Applications. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14061218>
- Arthur, A., & Gronthos, S. (2020). Clinical application of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells to repair skeletal tissue. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 24, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21249759>
- Becker Peres, L., Becker Peres, L., de Araújo, P. H. H., & Sayer, C. (2016). Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *140*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.12.033>
- Bernstein, Z. S., Kim, E. B., & Raje, N. (2022). Bone Disease in Multiple Myeloma: Biologic and Clinical Implications. In *Cells* (Vol. 11, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11152308>
- C J van de Donk, N. W., Pawlyn, C., & Yong, K. L. (2021). Seminar Multiple myeloma. In *www.thelancet.com* (Vol. 397). www.thelancet.com
- Caballero Aguilar, L. M., Duchi, S., Onofrillo, C., O'Connell, C. D., Di Bella, C., & Moulton, S. E. (2021). Formation of alginate microspheres prepared by optimized microfluidics parameters for high encapsulation of bioactive molecules. *Journal of Colloid and Interface Science*, *587*, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.026>
- Callander, N. S., Baljevic, M., Adekola, K., Anderson, L. D., Campagnaro, E., Castillo, J. J., Costello, C., Devarakonda, S., Elsedawy, N., Faiman, M., Garfall, A., Godby, K., Hillengass, J., Holmberg, L., Htut, M., Huff, C. A., Hultcrantz, M., Kang, Y., Larson, S., ... Kumar, S. K. (2022). Multiple Myeloma, Version 3.2022: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *20*(1), 8–19. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0002>
- Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J., & Zhang, K. (2021). Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>
- Capuana, E., Lopresti, F., Ceraulo, M., & La Carrubba, V. (2022). Poly-L-Lactic Acid (PLLA)-Based Biomaterials for Regenerative Medicine: A Review on Processing and Applications. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14061153>

- Clara-Trujillo, S., Ferrer, G. G., & Ribelles, J. L. G. (2020). In vitro modeling of non-solid tumors: How far can tissue engineering go? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16, pp. 1–31). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165747>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212749>
- Deng, Z., Wang, S., Zhou, B., Li, J., Zhou, P., Li, B., & Liang, H. (2020). Carboxymethylpachymaranzein coated plant microcapsules-based β -galactosidase encapsulation system for long-term effective delivery. *Food Research International*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108867>
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., & Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 295, 31–49. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.12.037>
- Faridi Esfanjani, A., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2017). Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.149>
- Fitzgerald, R., Bass, L. M., Goldberg, D. J., Graivier, M. H., & Lorenc, Z. P. (2018). Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA). *Aesthetic Surgery Journal*, 38, S13–S17. <https://doi.org/10.1093/asj/sjy012>
- García-Briega, M. I., Ródenas-Rochina, J., Martins, L. A., Lanceros-Méndez, S., Gallego Ferrer, G., Sempere, A., & Gómez Ribelles, J. L. (2022). Stability of Biomimetically Functionalised Alginate Microspheres as 3D Support in Cell Cultures. *Polymers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/polym14204282>
- García-Gomez, A. (2014). Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 322. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.322>
- García-Ortiz, A., Rodríguez-García, Y., Encinas, J., Maroto-Martín, E., Castellano, E., Teixidó, J., & Martínez-López, J. (2021). *cancers The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression*. <https://doi.org/10.3390/cancers>
- García-Sánchez, D., González-González, A., Alfonso-Fernández, A., Dujo-Gutiérrez, M. Del, Pérez-Campo, F. M., García-Sánchez, D., González-González, A., Dujo-Gutiérrez, M. Del, Pérez-Campo, F. M., & Alfonso-Fernández, A. (2023). Communication between bone marrow mesenchymal stem cells and multiple myeloma cells: Impact on disease progression. *World Journal of Stem Cells*, 15(5), 421–437. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v15.i5.421>
- Ge, H., Hu, Q., Chen, T., Yang, Y., Zhang, C., Zhong, J., Yin, Y., Jiang, X., Zhou, X., Wang, S., Hu, R., Li, W., & Feng, H. (2022). Transplantation of layer-by-layer assembled neural stem cells tethered with vascular endothelial growth factor reservoir promotes neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke in mice. *Applied Materials Today*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101548>

- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., & Knop, S. (2016). Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms. *Deutsches Arzteblatt International*, *113*(27–28), 470–476. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0470>
- Gharehbeglou, P., Jafari, S. M., Homayouni, A., Hamishekar, H., & Mirzaei, H. (2019a). Fabrication of double W1/O/W2 nano-emulsions loaded with oleuropein in the internal phase (W1) and evaluation of their release rate. *Food Hydrocolloids*, *89*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.020>
- Gharehbeglou, P., Jafari, S. M., Homayouni, A., Hamishekar, H., & Mirzaei, H. (2019b). Fabrication of double W1/O/W2 nano-emulsions loaded with oleuropein in the internal phase (W1) and evaluation of their release rate. *Food Hydrocolloids*, *89*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.020>
- González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, *12*(12), 1439–1690. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
- Grech, J. M. R., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2010). Processing and characterization of chitosan microspheres to be used as templates for layer-by-layer assembly. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *21*(6), 1855–1865. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4055-z>
- Herrera, M. T., Artunduaga, J. J., Ortiz, C. C., & Torres, R. G. (2017). Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Biomedica*, *37*(1), 11–21. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995>
- Hou, Z., Wei, H., Wang, Q., Sun, Q., Zhou, C., Zhan, C., Tang, X., & Zhang, Q. (2009). New method to prepare mitomycin c loaded pla-nanoparticles with high drug entrapment efficiency. *Nanoscale Research Letters*, *4*(7), 732–737. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9312-z>
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *496*(2), 173–190. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.10.057>
- Ji, X., Yuan, X., Ma, L., Bi, B., Zhu, H., Lei, Z., Liu, W., Pu, H. X., Jiang, J., Jiang, X., Zhang, Y., & Xiao, J. (2020). Mesenchymal stem cell-loaded thermosensitive hydroxypropyl chitin hydrogel combined with a three-dimensional-printed poly(ϵ -caprolactone) /nano-hydroxyapatite scaffold to repair bone defects via osteogenesis, angiogenesis and immunomodulation. *Theranostics*, *10*(2), 725–740. <https://doi.org/10.7150/thno.39167>
- Kim, A. L., Musin, E. V., Oripova, M. J., Oshchepkova, Y. I., Salikhov, S. I., & Tikhonenko, S. A. (2023). Polyelectrolyte Microcapsules—A Promising Target Delivery System of Amiodarone with the Possibility of Prolonged Release. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043348>
- Kumar, A., Belhaj, M., DiPette, D. J., & Potts, J. D. (2021). A Novel Alginate-Based Delivery System for the Prevention and Treatment of Pressure-Overload Induced Heart Failure. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.602952>

- Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *107*, 176–191. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.05.020>
- Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, *42*(2), 323–337. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>
- Leo, E., Brina, B., Forni, F., & Vandelli, M. A. (2004). In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *International Journal of Pharmaceutics*, *278*(1), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.002>
- Li, H., Chen, C., Zhang, S., Jiang, J., Tao, H., Xu, J., Sun, J., Zhong, W., & Chen, S. (2012). The use of layer by layer self-Assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Acta Biomaterialia*, *8*(11), 4007–4019. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.07.008>
- Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 1, Issue 12). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, *203*, 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>
- Lin, H., Yang, Y., Li, Y., Feng, X., Li, Q., Niu, X., Ma, Y., & Liu, A. (2023). Bioenhanced degradation of toluene by layer-by-layer self-assembled silica-based bio-microcapsules. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1122966>
- Liu, H., Li, W., Zhang, W., Sun, S., & Chen, C. (2023). Levothyroxine: Conventional and Novel Drug Delivery Formulations. In *Endocrine Reviews* (Vol. 44, Issue 3, pp. 393–416). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac030>
- Luo, Z., Dong, Y., Yu, M., Fu, X., Qiu, Y., Sun, X., & Chu, X. (2023). A novel insulin delivery system by β cells encapsulated in microcapsules. *Frontiers in Chemistry*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1104979>
- Ma, L., Mao, H. Y., Xu, J., Piao, J., & Piao, M. (2023). Study on the Nasal Drug Delivery System of NMD Liposomes In Situ Thermosensitive Gel. *AAPS PharmSciTech*, *24*(8). <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02679-5>
- Marinho, A., Nunes, C., & Reis, S. (2021). Hyaluronic acid: A key ingredient in the therapy of inflammation. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11101518>
- Marín-Payá, J. C., Clara-Trujillo, S., Córdón, L., Gallego Ferrer, G., Sempere, A., & Gómez Ribelles, J. L. (2022). Protein-Functionalized Microgel for Multiple Myeloma Cells' 3D Culture. *Biomedicines*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112797>
- Marín-Payá, J. C., Díaz-Benito, B., Martins, L. A., Trujillo, S. C., Córdón, L., Lanceros-Méndez, S., Ferrer, G. G., Sempere, A., & Ribelles, J. L. G. (2021). Biomimetic 3d environment based on microgels as a model for the generation of drug resistance in multiple myeloma. *Materials*, *14*(23). <https://doi.org/10.3390/ma14237121>

- Massadeh, S., Almohammed, I., Barhoush, E., Omer, M., Aldhawi, N., Almalik, A., & Alaamery, M. (2021). Development of epirubicin-loaded biocompatible polymer pla-peg-pla nanoparticles: Synthesis, characterization, stability, and in vitro anticancerous assessment. *Polymers*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/polym13081212>
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., Andreeff, M., & Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 5, pp. 285–298). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>
- Meng, W., Sun, H., Mu, T., & Garcia-Vaquero, M. (2023). Pickering emulsions with chitosan and macroalgal polyphenols stabilized by layer-by-layer electrostatic deposition. *Carbohydrate Polymers*, *300*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120256>
- Mushtaq, F., Raza, Z. A., Batool, S. R., Zahid, M., Onder, O. C., Rafique, A., & Nazeer, M. A. (2022). Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 218, pp. 601–633). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>
- Nisisako, T., Okushima, S., & Torii, T. (2005). Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. In *Soft Matter* (Vol. 1, Issue 1, pp. 23–27). <https://doi.org/10.1039/b501972a>
- Pavot, V., Rochereau, N., Primard, C., Genin, C., Perouzel, E., Lioux, T., Paul, S., & Verrier, B. (2013). Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *Journal of Controlled Release*, *167*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.015>
- Rajisha, K., Depa, B., & Pothan, S. T. (2011). *Interface engineering of natural fibre composites*.
- Ramazani, F., Chen, W., Van Nostrum, C. F., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T., Hennink, W. E., & Kok, R. J. (2016). Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 499, Issues 1–2, pp. 358–367). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.020>
- Rastogi, P., & Kandasubramanian, B. (2019). Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*, *11*(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab331e>
- Reyes Ortega, F., Rodríguez, G., Rosa Aguilar, M., García-Sanmartín, J., Martínez, A., & San Román, J. (2012). Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales*, Vol. 20 Núm. 1. <https://doi.org/10.5821/sibb.v20i1.4664>
- Ribeiro, C., Sencadas, V., Costa, C. M., Gómez Ribelles, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2011). Tailoring the morphology and crystallinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes. *Science and Technology of Advanced Materials*, *12*(1). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/12/1/015001>

- Rodriguez-Otero, P., Paiva, B., & San-Miguel, J. F. (2021). Roadmap to cure multiple myeloma. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 100). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102284>
- Saravanakumar, K., Park, S. J., Santosh, S. S., Ganeshalingam, A., Thiripuranathar, G., Sathiyaseelan, A., Vijayasathay, S., Swaminathan, A., Priya, V. V., & Wang, M. H. (2022). Application of hyaluronic acid in tissue engineering, regenerative medicine, and nanomedicine: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 222, pp. 2744–2760). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.055>
- Singhal, R., & Gupta, K. (2016). A Review: Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters). *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 55(1), 54–70. <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1050520>
- Sklaventis-Pistofidis, R., Bustoros, M., & Ghobrial, I. M. (2019). Bone marrow niche in multiple myeloma and its precursor states. *HemaSphere*, 3(S2), 121–123. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000246>
- Solimando, A. G., Malerba, E., Leone, P., Prete, M., Terragna, C., Cavo, M., & Racanelli, V. (2022). Drug resistance in multiple myeloma: Soldiers and weapons in the bone marrow niche. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.973836>
- Song, M. G., Jho, S. H., Kim, J. Y., & Kim, J. D. (2000). Rapid evaluation of water-in-oil (w/o) emulsion stability by turbidity ratio measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 230(1), 213–215. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7090>
- Song, M.-G., Cho, S.-H., Kim, J.-Y., & Kim, D. (2002). Novel Evaluation Method for the Water-in-Oil (W/O) Emulsion Stability by Turbidity Ratio Measurements. In *Korean J. Chem. Eng* (Vol. 19, Issue 3).
- Su, Y., Zhang, B., Sun, R., Liu, W., Zhu, Q., Zhang, X., Wang, R., & Chen, C. (2021). PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. *Drug Delivery*, 28(1), 1397–1418. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938756>
- Varga, N., Hornok, V., Janovák, L., Dékány, I., & Csapó, E. (2019). The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.012>
- Wang, F., Su, H., Xu, D., Dai, W., Zhang, W., Wang, Z., Anderson, C. F., Zheng, M., Oh, R., Wan, F., & Cui, H. (2020). Tumour sensitization via the extended intratumoural release of a STING agonist and camptothecin from a self-assembled hydrogel. *Nature Biomedical Engineering*, 4(11), 1090–1101. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0597-7>
- Wani, S. U. D., Ali, M., Mehdi, S., Masoodi, M. H., Zargar, M. I., & Shakeel, F. (2023). A review on chitosan and alginate-based microcapsules: Mechanism and applications in drug delivery systems. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 248). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125875>
- Yang, K., Wang, X., Huang, R., Wang, H., Lan, P., & Zhao, Y. (2022). Prebiotics and Postbiotics Synergistic Delivery Microcapsules from Microfluidics for Treating Colitis. *Advanced Science*, 9(16). <https://doi.org/10.1002/adv.202104089>

- Yao, F., Xu, P., Jia, H., Li, X., Yu, H., & Li, X. (2022). Thermogravimetric Analysis on a Resonant Microcantilever. *Analytical Chemistry*, 94(26), 9380–9388. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01374>
- Zhu, Y. Y., Zhang, G. Y., Hong, X. L., Dong, J. F., & Xia, B. L. (2006). Influence of emulsifiers on the synthesis of insulin-loaded nanocapsules in double emulsion. *Chinese Journal of Chemistry*, 24(1), 109–113. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200690003>

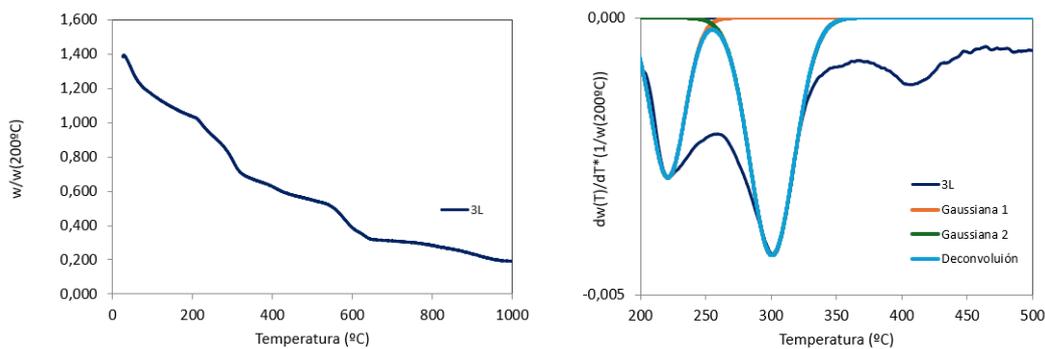
7. ANEXOS

7.1 ANEXO I. Resultados del TGA sobre las microesferas recubiertas

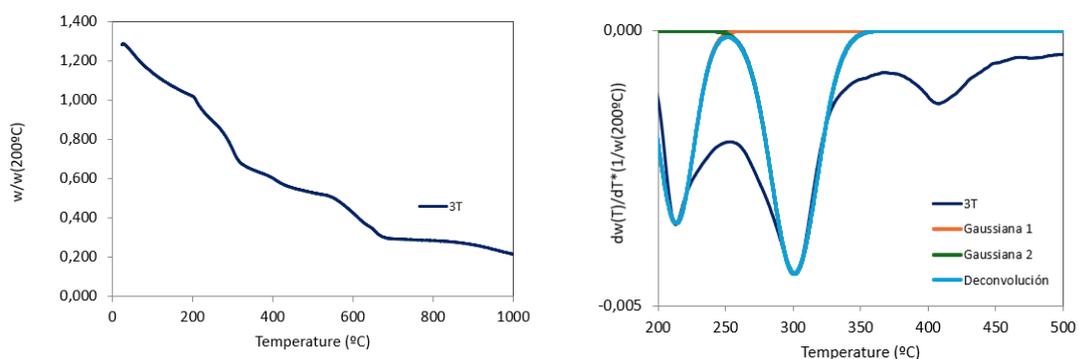
Para cada una de las condiciones de recubrimiento estudiadas se muestran dos curvas.

- 1) La curva del peso normalizado por el peso seco frente a la temperatura, donde se visualiza la caída del peso de la muestra conforme aumenta la temperatura en forma de escalones. Cada escalón corresponde a una caída del peso a una cierta temperatura (o a un rango estrecho de temperatura)
- 2) Representación gráfica de la derivada respecto a la temperatura del peso normalizado por el peso seco. Las caídas de peso se convierten en una sucesión de picos. En este caso interesan dos primeros picos de degradación térmica del alginato, que pueden modelizarse con dos gaussianas para individualizarlos y calcular el área de cada uno. En las segundas gráficas se muestra la derivada original (azul oscuro), las distribuciones normales o gaussianas que la modelizan (naranja y verde) y la suma de las normales coincidente con los dos picos de interés (azul claro).

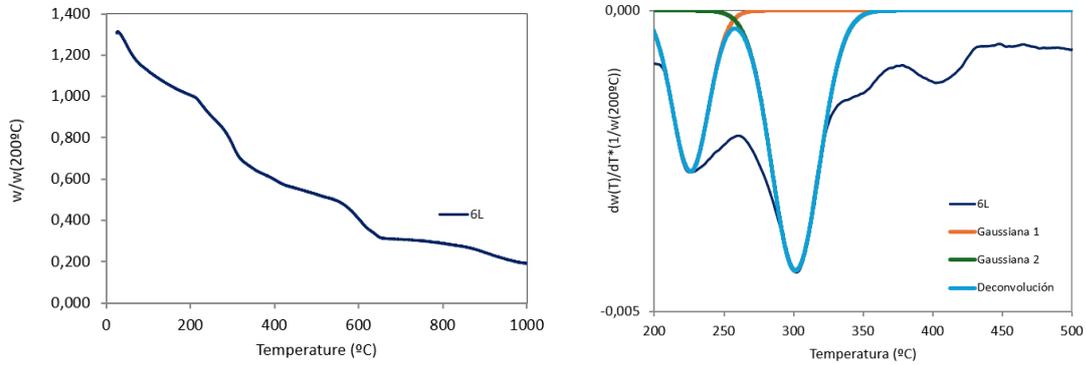
Microesferas con 3 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (3L):



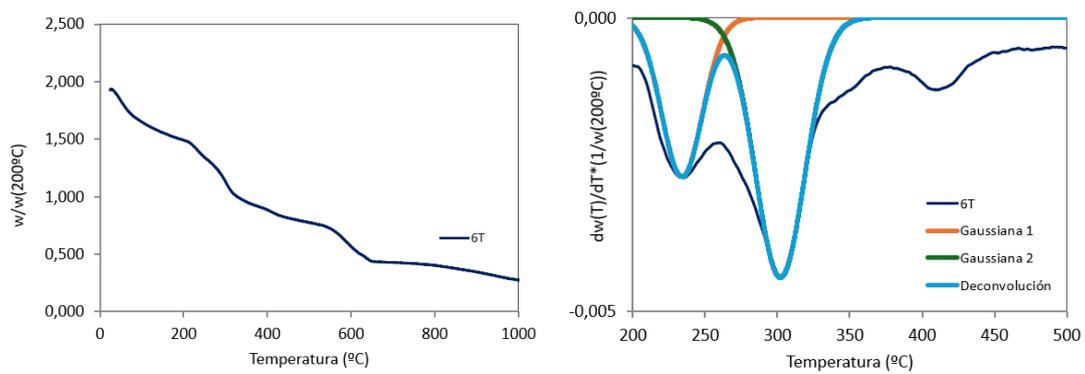
Microesferas con 3 bicapas GelA/HA entrecruzadas (3T):



Microesferas con 6 bicapas GelA/HA sin entrecruzar (6L):



Microesferas con 6 bicapas GelA/HA entrecruzadas (6T):



Si se comparan las derivadas del peso normalizado por el peso seco respecto a la temperatura de las condiciones recubiertas frente a la condición control sin recubrimiento, se aprecia cómo los dos primeros picos de degradación térmica del alginato entre 200 y 350°C son menos pronunciados en las microesferas con recubrimiento, ya que la pérdida de peso debida a estos dos picos del alginato es menor puesto que el alginato representa un menor porcentaje de la microesfera debido a la presencia del recubrimiento.

7.2 ANEXO II. Fotografías y mediciones del ensayo de estabilidad

En este anexo se muestran las fotografías obtenidas en el ensayo de estabilidad realizado. El orden de las imágenes es: microesferas control, microesferas con recubrimiento de 3 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (3L), microesferas con recubrimiento de 3 bicapas Gela/HA entrecruzadas (3T), microesferas con recubrimiento de 6 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (6L), y microesferas con recubrimiento de 6 bicapas Gela/HA entrecruzadas (6T). Dentro de cada una de las condiciones se muestran imágenes a tiempo 0 horas, 2 horas, 7 horas y 22 horas, en los tres medios estudiados: agua, RPMI y RPMI suplementado con enzimas. Escala: 100 μ m, para todas las imágenes.

Además, también se indica el diámetro medio (μ m) de las 150 microesferas medidas en cada condición.

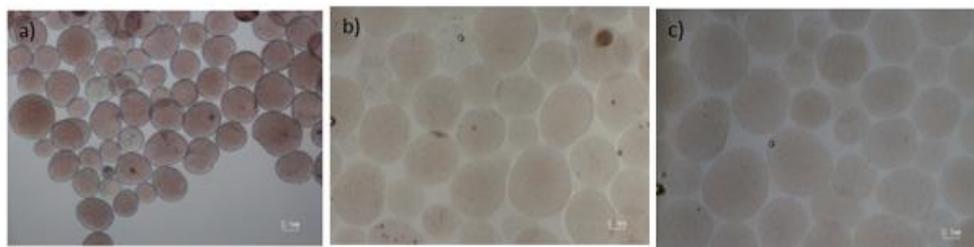
Microesferas control:

- 0 horas



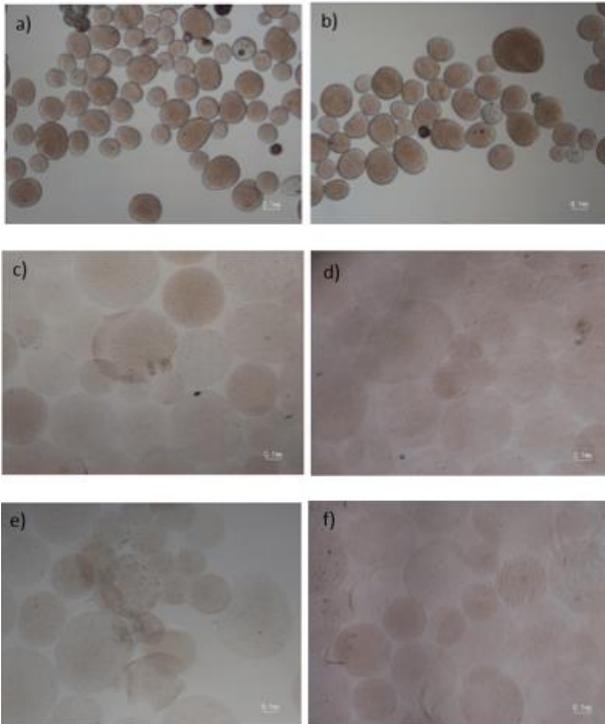
a) Agua, 177,45 μ m. b) Medio RPMI, 279,73 μ m. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 303,30 μ m.

- 2 horas



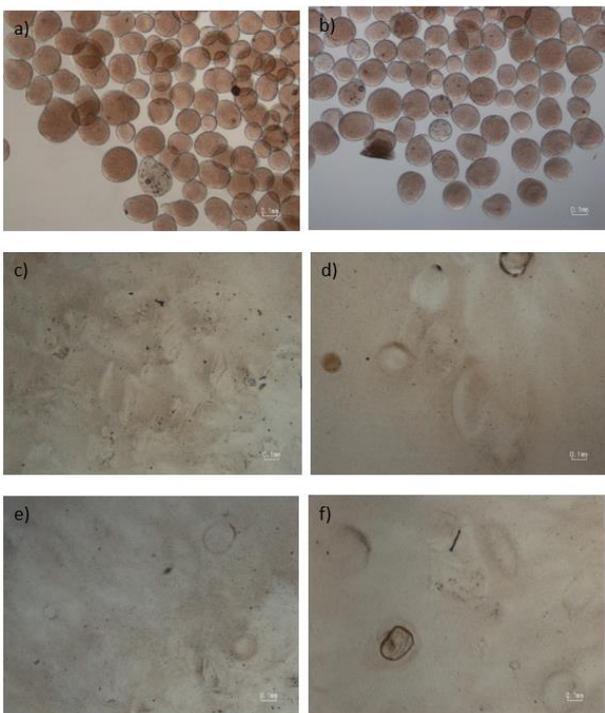
a,b) Agua, 179,39 μ m. b) Medio RPMI, 318,50 μ m. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 279,88 μ m.

- 7 horas



a,b) Agua, 176,86 μm . c,d) Medio RPMI, 405,40 μm . e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 368,28 μm .

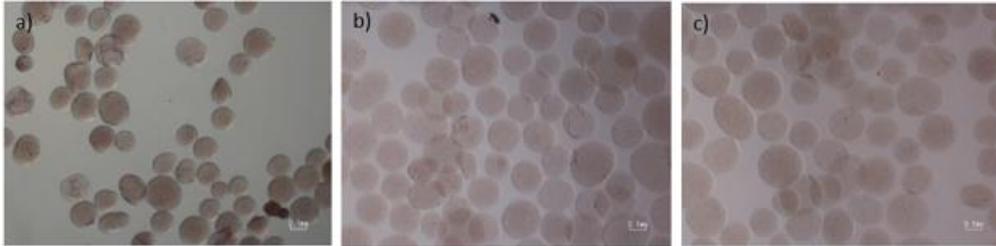
- 22 horas



a,b) Agua, 179,26 μm . c,d) Medio RPMI. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa.

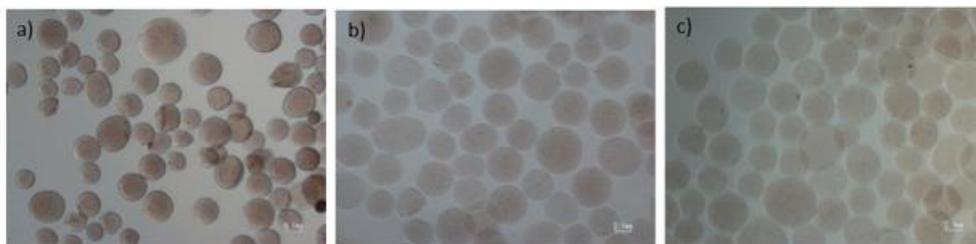
Microesferas con recubrimiento de 3 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (3L):

- 0 horas



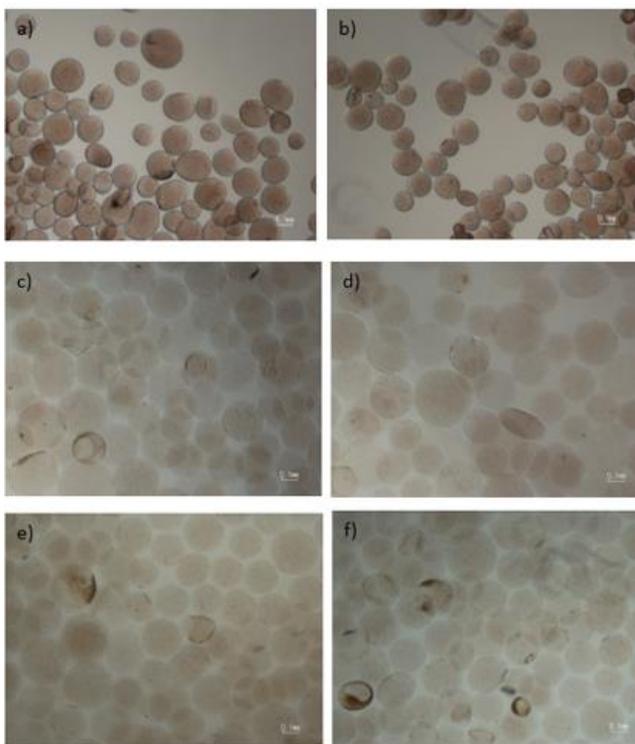
a) Agua, 158,54 µm. b) Medio RPMI, 214,35 µm. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 214,18 µm.

- 2 horas



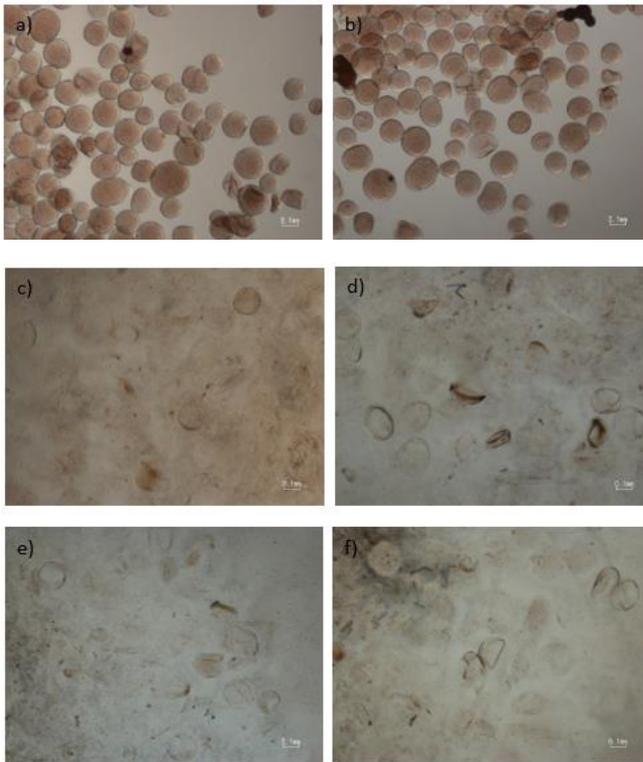
a) Agua, 163,42 µm. b) Medio RPMI, 207,25 µm. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 218,73 µm.

- 7 horas



a,b) Agua, 163,05 µm. c,d) Medio RPMI, 239,70 µm. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 249,61 µm.

- 22 horas



a,b) Agua, 156,69 μm . c,d) Medio RPMI. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y collagenasa.

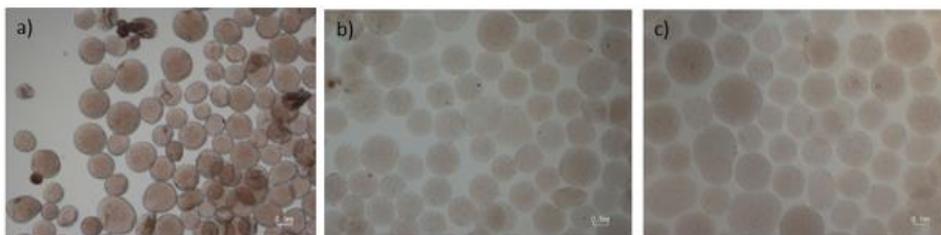
Microesferas con recubrimiento de 3 bicapas Gela/HA entrecruzadas (3T):

- 0 horas



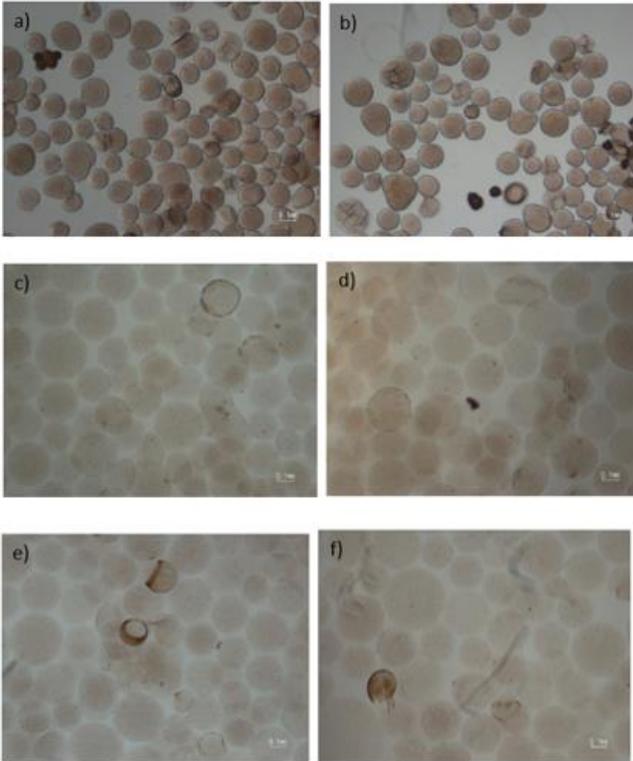
a) Agua, 156,38 μm . b) Medio RPMI, 214,39 μm . c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y collagenasa, 227,73 μm .

- 2 horas



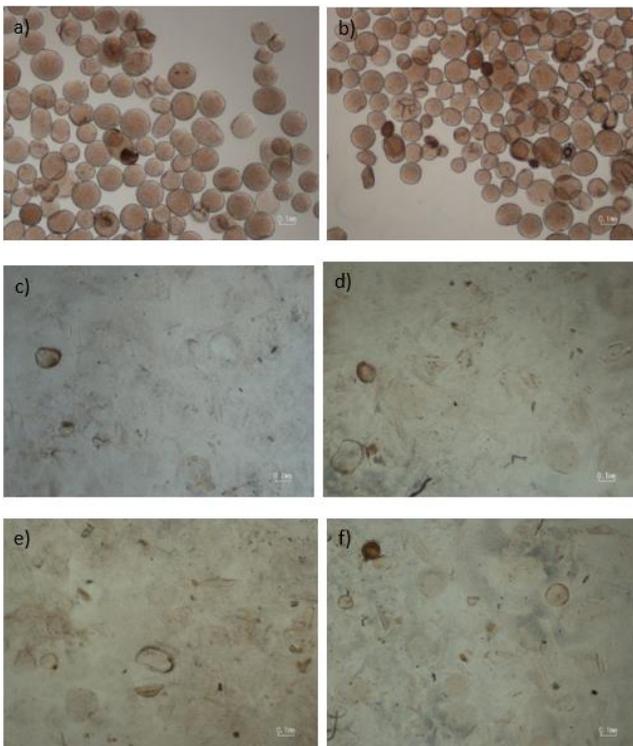
a) Agua, 161,64 μm . b) Medio RPMI, 222,39 μm . c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y collagenasa, 227,69 μm .

- 7 horas



a,b) Agua, 160,48 μm . c,d) Medio RPMI, 259,52 μm . e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 258,20 μm .

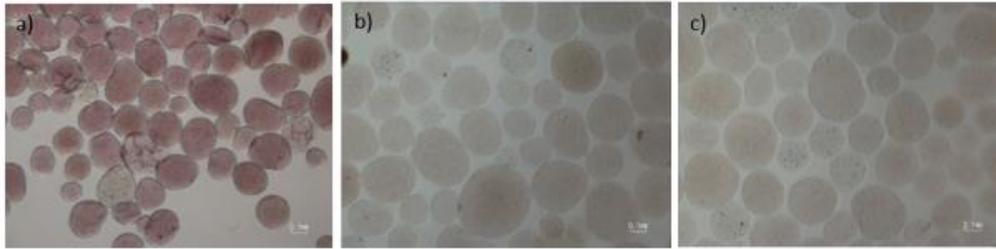
- 22 horas



a,b) Agua, 157,04 μm . c,d) Medio RPMI. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa.

Microesferas con recubrimiento de 6 bicapas Gela/HA sin entrecruzar (6L):

- 0 horas



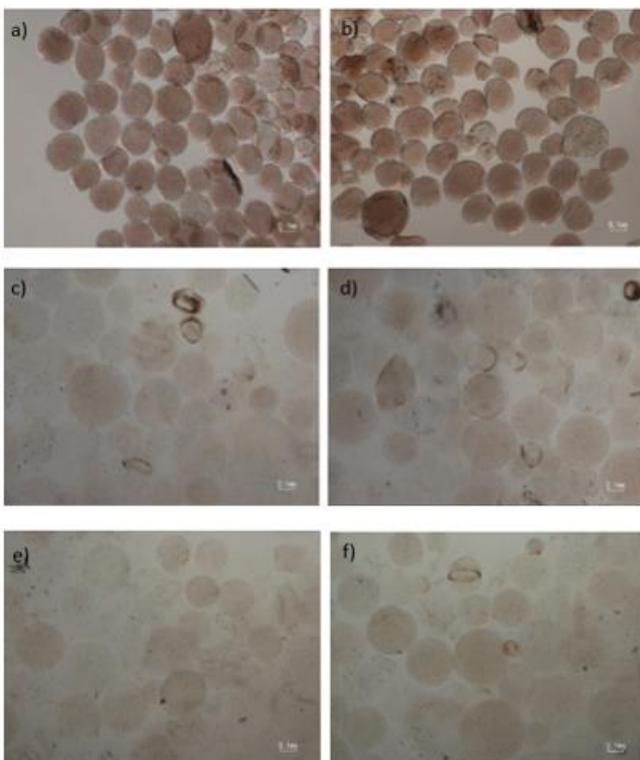
a) Agua, 190,48 μm. b) Medio RPMI, 256,20 μm. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 252,31 μm.

- 2 horas



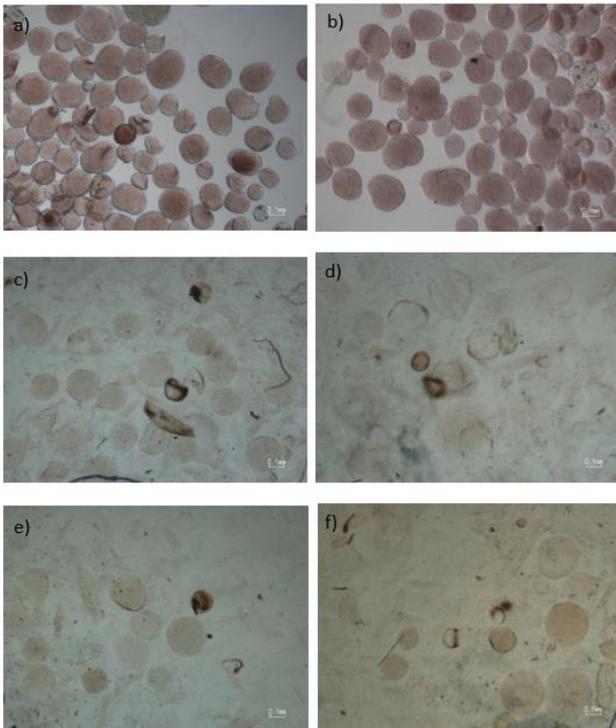
a) Agua, 190,00 μm. b) Medio RPMI, 259,93 μm. c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 250,05 μm.

- 7 horas



a,b) Agua, 191,36 μm. c,d) Medio RPMI, 279,11 μm. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 276,76 μm.

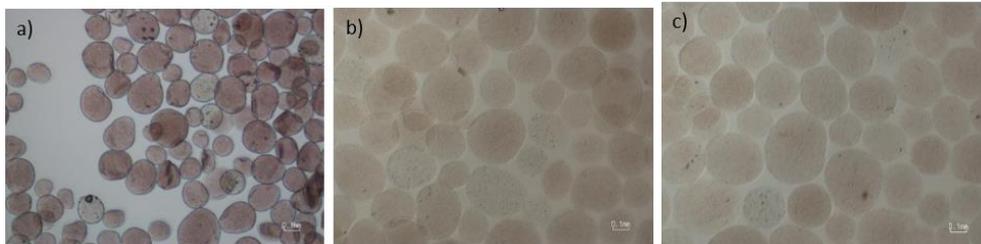
- 22 horas



a,b) Agua, 187,94 μm . c,d) Medio RPMI. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa.

Microesferas con recubrimiento de 6 bicapas Gela/HA entrecruzadas (6T):

- 0 horas



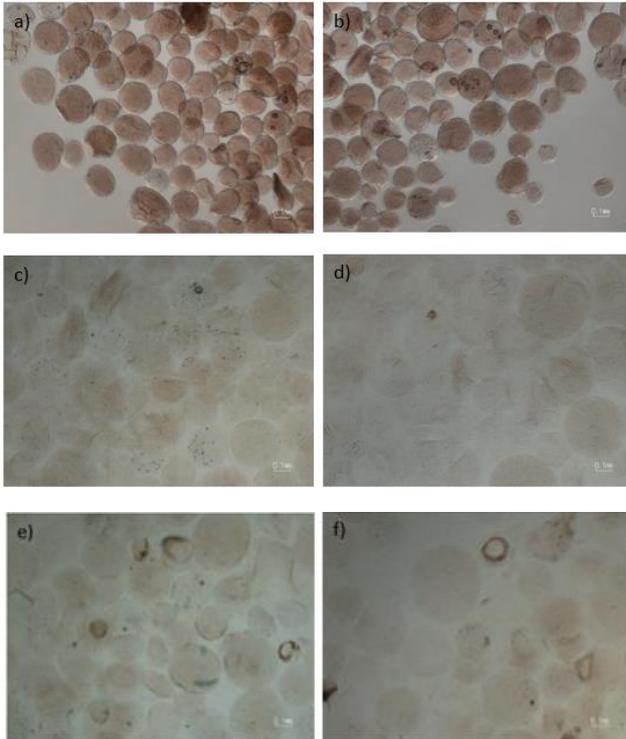
a) Agua, 182,31 μm . b) Medio RPMI, 262,64 μm . c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 270,17 μm .

- 2 horas



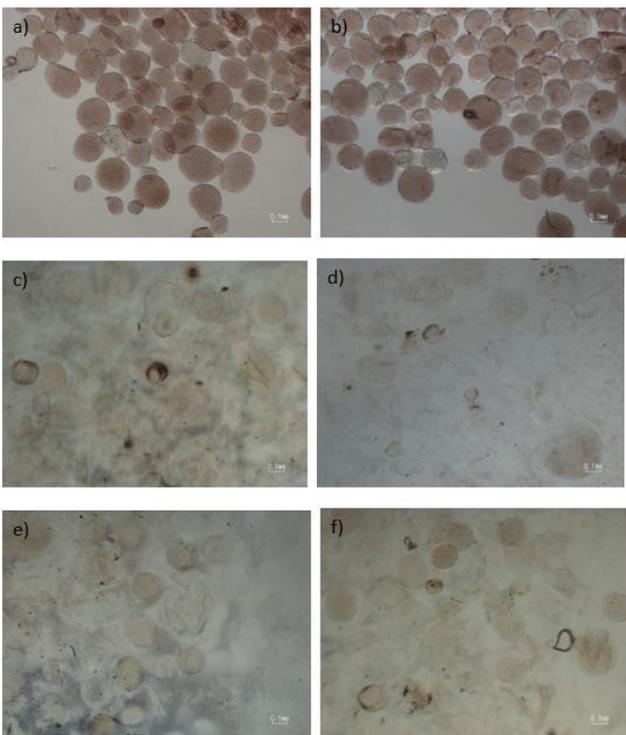
a) Agua, 178,88 μm . b) Medio RPMI, 278,82 μm . c) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 286,83 μm .

- 7 horas



a,b) Agua, 183,11 μm . c,d) Medio RPMI, 278,31 μm . e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa, 284,90 μm .

- 22 horas



a,b) Agua, 180,44 μm . c,d) Medio RPMI. e,f) Medio RPMI suplementado con hialuronidasa y colagenasa.