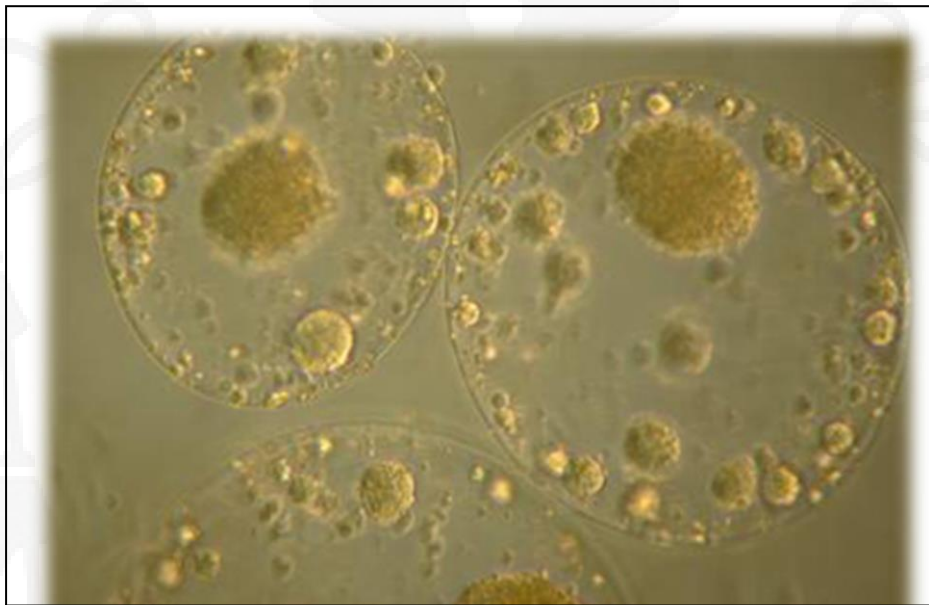


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

TECNOLOGÍA DE LA MICROENCAPSULACIÓN CELULAR EN LA TERAPÉUTICA MÉDICA



Hepatocitos humanos encapsulados.
Fuente: http://www.visceral-surgery.ch/visceral/index.php?option=com_content&view=article&id=85&Itemid=60&lang=en

Carmen García Hernández

Morfología y Biología Celular / Universidad de Oviedo

Junio/2015



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA





Resumen

El presente Trabajo de Fin de Grado describe un posible tratamiento para diversas patologías mediante el uso de células que pueden ser modificadas genéticamente para secretar el fármaco de interés en el lugar de implantación, lo que mejora la calidad de vida del paciente por la mayor eficacia en el alivio o cura de una enfermedad y la reducida toma de medicamentos. Esta idea se plantea hace casi un siglo, pero es en estos últimos años cuando la estrategia terapéutica realiza un avance significativo para su cada vez más cercana comercialización, gracias al descubrimiento de materiales que consiguen una menor inflamación con formación de tejido fibrótico alrededor de las microcápsulas, a la posible inducción de apoptosis de las células implantadas (una vez que el periodo de administración de la molécula concluye), y a la capacidad de monitorización del área tratada tras la degradación o extracción de las microcápsulas (mediante la comprobación de que no queden restos de las mismas en el organismo del paciente).

La metodología de la encapsulación celular consiste en la suspensión de células en una matriz que se recubre de distintas capas porosas. Los dispositivos resultantes están constituidos por materiales de alta bioseguridad y biocompatibilidad, que permiten que las microcápsulas posean estabilidad mecánica y una membrana externa semipermeable. Además, es posible el almacenamiento de los dispositivos a largo plazo mediante la técnica de criopreservación.

Por último, se presentan y discuten los resultados obtenidos en experimentos que buscan una terapia eficaz para distintas enfermedades y se llega a la conclusión de que esta tecnología tiene un futuro prometedor.

Abstract

The present Bachelor's Degree Final Project describes a possible treatment for several pathologies by using cells that can be genetically modified to secrete the drug of interest in the implantation site, which improves the quality of life of the patient by the increased effectiveness in the relief or cure of a disease and the reduced medication. This idea arises almost a century ago, but it's in recent years when the therapeutic strategy makes a significant advance for its ever closer marketing, thanks to the discovery of materials that get less inflammation with formation of fibrotic tissue around the microcapsules, to the possible induction of apoptosis in implanted cells (once the period of molecule administration ends) and the ability to monitor the treated area after the degradation or removal of the microcapsules (by checking that no remnants of them are in the patient's body).

The methodology of cell encapsulation consists in the suspension of cells in a matrix that is coated with different porous layers. The resulting devices are constituted by materials of high biosecurity and biocompatibility, that allow the microcapsules to have mechanical stability and a semipermeable outer membrane. In addition, it is possible to store the devices during long-term using the cryopreservation technique.

Finally, the results of experiments that search an effective therapy for various diseases are presented and discussed, and it is concluded that this technology has a promising future.





Índice

1. Introducción	4
1.1. Historia	4
1.2. Objetivo	5
1.3. Patentes	6
1.4. Aplicación en distintos campos	6
2. Metodología	8
2.1. Componentes de las microcápsulas	10
2.1.1. Recubrimiento externo	10
2.1.2. Matriz interna	11
2.1.3. Contenido	12
2.2. Proceso de encapsulación	13
2.3. Características específicas según su empleo	15
2.4. Criopreservación	17
3. Resultados	18
4. Discusión	23
4.1. Conclusiones	27
5. Bibliografía	28
5.1. Enlaces interesantes	30





1. Introducción

La estrategia terapéutica de microencapsulación celular es una tecnología que pretende ser una aplicación de uso habitual en la medicina futura, dirigida, sobretodo, al paciente con una enfermedad crónica. Este sistema de administración se basa en la liberación mantenida de un fármaco por parte de células inmovilizadas en el interior de estructuras poliméricas (*microcápsulas*), en ausencia de inmunosupresión y estrés mecánico (Sakata y cols., 2012), y sin interferencia de la matriz con la función de las células. De este modo, estas se mantienen viables durante largos periodos de tiempo (de semanas a años), se cumplen las terapias y se mejora la eficacia del tratamiento (Spuch y cols., 2010; Hernández y cols., 2011). Esto hace viable la realización de **xenotrasplantes** (procedentes de cerdos o primates), y **alotrasplantes**, siempre y cuando se haga un examen previo de las líneas celulares para comprobar la no existencia de virus y tumorigenicidad, y evitando que, una vez dentro de la microcápsula, no cambien sus propiedades funcionales (Orive y cols., 2003).

Algunas de las enfermedades en las que es posible aplicar terapias basadas en la microencapsulación de células son las relativas al sistema nervioso central (Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington); alteraciones endocrinas (enanismo, hipoparatiroidismo); cáncer, diabetes, cirrosis, hemofilia y anemia. En resumen, este método puede emplearse para un tratamiento localizado (tumores sólidos), regional (cerebro) o sistémico (diabetes) (Pedraz y Orive, 2004).

1.1. Historia

La idea de introducir células encapsuladas la tuvo el científico Bisceglie en la tercera década del siglo XX, cuando introdujo células neoplásicas de roedor en membranas poliméricas, las cuales trasplantó en la cavidad abdominal de cerdos, comprobando que el sistema inmune de estos no les afectaba. Más tarde, se dio a conocer el concepto de **encapsulación** para referirse al trasplante celular sin el requerimiento de inmunosupresores (Pedraz y Orive, 2004). En 1980, Lim y Sun describieron la microencapsulación de tejidos en cápsulas de alginato-polilisina-alginato (Figura) (Zhang y cols., 2008; De Vos y cols., 1997).

Hasta el año 2011, estos sistemas de inmovilización celular se estudiaron en ensayos preclínicos (“in vitro” y con animales de experimentación), para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, cardiovasculares y óseas; solo se realizaron ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer y de la diabetes, obteniendo resultados satisfactorios (Hernández y cols., 2011). Por otra parte, este año 2015 se



dio a conocer un ensayo preclínico “in vitro” que presenta una posible solución para el tratamiento de enfermedades del colon, las cuales son difíciles de tratar debido a que los fármacos administrados por vía oral son absorbidos en el estómago e intestino, y los suministrados por vía intravenosa, son eliminados antes de llegar a la zona afectada. Este remedio consiste en la ingestión vía bucal de microcápsulas que contienen el medicamento y que están recubiertas del polisacárido inulina (procedente de la alcachofa). Esta molécula no puede ser absorbida ni en el estómago, ni en el intestino delgado, pero sí degradada por las bacterias del colon, luego el fármaco encapsulado es liberado específicamente en la parte final del aparato digestivo. Señalar que, debido a que la inulina es soluble en agua, los investigadores tuvieron que preparar microcápsulas recubiertas con un derivado insoluble, como el cinamato de inulina. Estos sistemas de administración (con apariencia de polvo fino) se mezclan con almidón en cápsulas de mayor tamaño que finalmente el paciente ingiere (López-Molina y cols., 2015).

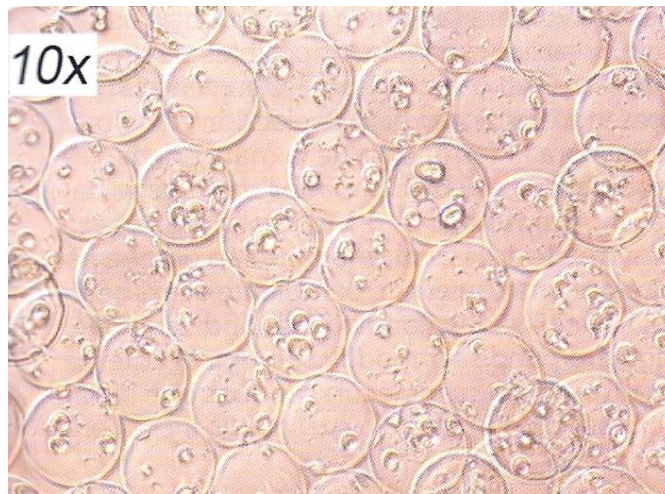


Figura . Microcápsulas de alginato poli-L-lisina alginato de 100 μm de diámetro. Fotografía de microscopía óptica.

Fuente: (Hernández y cols., 2011).

1.2. Objetivo

La microencapsulación de células es un tema de interés sobre el que investigar, pues cabe la posibilidad de dar solución al problema de rechazo inmunológico que se presenta con los trasplantes y de reducir la frecuencia de administración de fármacos, mejorando así, la calidad de vida del paciente. Por lo que, el objetivo de este trabajo es analizar las características de este sistema de administración y examinar los resultados obtenidos en algunos estudios publicados, tras la inserción de los dispositivos en enfermos con patologías difíciles de tratar.



1.3. Patentes

A continuación se muestran algunas patentes registradas en estos últimos años:

- Patente de Hernández y cols., 2010. Ref: WO2010010223 A1: Microbiosistema farmacéutico (diámetro inferior a 1 mm), para implantar a nivel del córtex cerebral. Contiene células modificadas genéticamente para sintetizar factores neurotróficos y/o angiogénicos de forma continua como método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Hernández y cols., 2010).
- Patente de Orive y cols., 2009. Ref: WO 2009000955 A1: Microcápsulas de alginato modificado con el péptido fibronectina (que posee la secuencia Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD)), el cual se une a las integrinas facilitando la adhesión de las células inmovilizadas a la matriz. Estos dispositivos (diámetro inferior a 1 mm) poseen una mayor resistencia física y permiten que las células estén a una distancia máxima de 100 a 200 μm respecto a la fuente de nutrientes (capilar), garantizando así, un aporte óptimo de estos (Orive y cols., 2009).
- Patente de Hubbell y cols., 2004. Ref: ES2220906 T3: Microcápsula que consta de un polímero biodegradable, como el polietilén glicol, que es un hidrogel biocompatible, permeable a gases y nutrientes, capaz de polimerizarse en contacto con células y tejidos vivos en un breve período de tiempo, y útil para aplicaciones biomédicas en las que se desea que la superficie de la microcápsula no se adhiera a las células para evitar generar trombos. La permeabilidad, la rigidez y el grosor de la membrana de la cápsula (que varía entre 50 y 300 μm) se puede modificar variando la concentración del polímero (Hubbell y cols., 2004).

1.4. Aplicación en distintos campos

Evaluación de la viabilidad y el efecto de la utilización de este tratamiento en diversas patologías:

- Los pacientes enfermos de Alzheimer presentan toxicidad, así como pérdida neuronal y vascular debido al depósito del péptido beta-amiloide ($A\beta$) en la pared endotelial de los vasos sanguíneos cerebrales, los cuales degeneran, causando una inflamación local. Para tratar esta enfermedad neurodegenerativa se propuso utilizar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína angiogénica con propiedades neurotróficas y neuroprotectoras, que inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno inducidas por el $A\beta$ y la agregación de dicha proteína. Por eso se





pensó en una estrategia terapéutica basada en la implantación de fibroblastos encapsulados que secretaran esta molécula (Spuch y cols., 2010). Este estudio de laboratorio se hizo en fase preclínica “in vivo”.

- Para el tratamiento de la cardiopatía isquémica, ocasionada por la arteriosclerosis de las arterias coronarias y cuya manifestación clínica ocurre a través del infarto de miocardio, también se utilizaron microcápsulas con células secretoras de VEGF para inducir el proceso de angiogénesis (Zhang y cols., 2008; Fácila, 2015; Espinosa, 2015). Este ensayo fue realizado, al igual que el anterior mencionado, en fase preclínica “in vivo”.

- La retinosis pigmentaria hace referencia a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas de la retina que causan la muerte de las células fotorreceptoras, lo que causa la pérdida progresiva de la visión. Con el fin de remediar esto, se pensó en utilizar el factor neurotrófico ciliar (CNTF) para tratar la neurodegeneración retiniana en humanos en fase clínica I, ya que anteriormente, se había conseguido retardarla con experimentos en animales y parecía efectivo en el retraso de la pérdida celular y funcional retiniana. Sin embargo, debido a que la barrera hematorretiniana restringe el acceso desde el sistema sanguíneo al tejido neurorretiniano, atravesarlo era un desafío la administración, a largo plazo, de la proteína terapéutica a la retina. Para superar este reto, se propuso la tecnología de la encapsulación celular, ya que en estudios preclínicos, este sistema había permitido que el CNTF proporcionara protección a los fotorreceptores del ojo de un perro con la mutación *rcd1*. Las microcápsulas de este ensayo, que contenían células del epitelio pigmentario de la retina humana transfectadas con el gen de CNTF, para producir la proteína “in situ”, habían sido implantadas en el vítreo del ojo de este animal y después pudieron ser retirados los implantes del órgano visual, lo que supuso un nivel adicional de seguridad (Sieving y cols., 2006).

- Dado que no hay tratamiento para la pérdida de visión causada por la atrofia geográfica (avanzada degeneración macular asociada con la edad, de tipo seca), se evaluó el efecto de la liberación a largo plazo del CNTF, por células microencapsuladas implantadas en la cámara posterior del ojo, puesto que parecía que esta molécula ralentizaba la progresiva pérdida de visión causada por esta enfermedad. Este estudio de laboratorio fue realizado en fase clínica II (Zhang y cols., 2011).





- Respecto a la enfermedad de Huntington, Emerich y cols. demostraron en 1997, que el implante de cápsulas con fibroblastos secretores de CNTF en monos, proporcionaba neuroprotección sobre las neuronas colinérgicas y GABAérgicas (Pedraz y Orive, 2004). Este ensayo fue realizado en fase preclínica “in vivo”.
- Tras los buenos resultados obtenidos en roedores y otros mamíferos para tratar la diabetes tipo I, a mediados de los noventa del siglo XX, se inmovilizaron islotes de Langerhans porcinos neonatales en microcápsulas de APA (Alginato-Polilisina-Alginato), para la realización del primer ensayo clínico en humanos. El resultado fue que, el único paciente incluido en este estudio no necesitó la administración de insulina exógena durante un mes, además se redujeron sus niveles de albúmina sérica glicosilada y hemoglobina A1c, mejorando también la sintomatología ligada a su neuropatía periférica. Actualmente, esta investigación se encuentra en fase clínica II (Pedraz y Orive, 2004; Gurruchaga y cols., 2015).
- En el tratamiento del cáncer se emplearon microcápsulas de APA con células de ovario de hámster (transformadas para secretar endostatina), que produjeron una inhibición del crecimiento del melanoma subcutáneo de ratones. También se obtuvo el mismo efecto con células secretoras de angiostatina para ratones con cáncer de mama (Domínguez-Gil, 2012). Estos estudios de laboratorio se realizaron en fase preclínica “in vivo”. La investigación en tumores cerebrales, aún se encuentra en fase preclínica “in vitro”. El carcinoma pancreático, actualmente ya está en humanos, en fase clínica I (Gurruchaga y cols., 2015).

2. Metodología

La encapsulación consiste en inmovilizar células secretoras de un fármaco en una matriz polimérica. Estas se recubren de una membrana semipermeable e inmunoaislante (Figura 2), que permite la entrada de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento, y la salida de fármacos y desechos celulares. También, la porosidad de la membrana externa de las microcápsulas, impide la entrada de componentes del sistema inmunológico del enfermo (Figura 3) (Zhang y cols., 2008), para que los receptores de los linfocitos T, las inmunoglobulinas y el sistema del complemento no puedan interactuar o tengan dificultades en la realización de esta acción con los antígenos de superficie de las células encapsuladas.



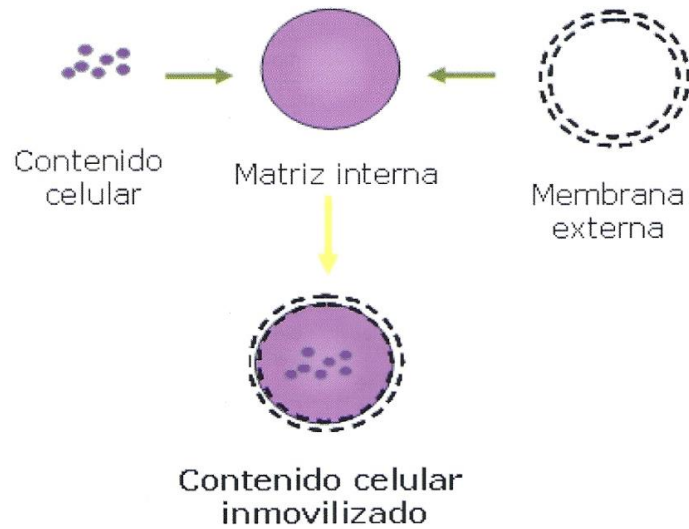


Figura 2. Componentes de las microcápsulas.

Fuente: Hernández y cols., 2011.

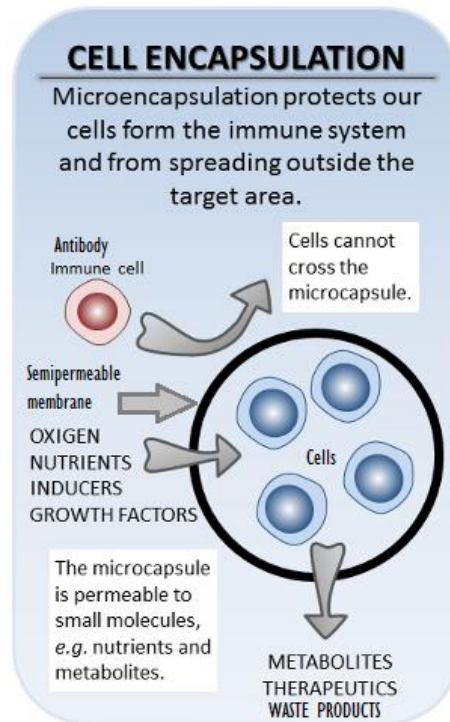


Figura 3. Relación con el ambiente de la microcápsula.

Fuente: modificado de <http://2012.igem.org/Team:Slovenia/SafetyMechanismsMicrocapsuleDegradation/>

Debido a que el trasplante de microcápsulas heterogéneas e irregulares está relacionado con una mayor probabilidad de rechazo, su diseño debe ser uniforme y reproducible (son esféricas para que la relación superficie/volumen permita una mejor difusión de las sustancias a través de su membrana (Hernández y cols., 2011)); debe



tener valores exactos de permeabilidad, tamaño y superficie, así como poseer la capacidad para proteger la viabilidad e integridad de las células con el fin de disminuir o reducir el poder citotóxico del sistema de defensa. Además, el hecho de que estos dispositivos tengan estabilidad mecánica, permite reducir posibles rupturas a causa de la manipulación, inserción, estrés osmótico, golpes mecánicos, movimientos del enfermo, etc (Pedraz y Orive, 2004).

Es fundamental que la microcápsula impida, ante una proliferación celular descontrolada, la salida de las células terapéuticas para evitar activar el sistema inmunológico de la persona. No obstante, se ha priorizado el uso de células con baja o nula capacidad de multiplicación y se ha establecido que el número de estas por cápsula sea limitado (no puede exceder el 5-10 % del volumen total del dispositivo) (Gurruchaga y cols., 2015), al igual que el número de microcápsulas trasplantables (Pedraz y Orive, 2004). Señalar que estos sistemas necesitan ser administrados en un elevado número para poder lograr el efecto terapéutico, presentan lentitud al difundir los productos, y su presencia origina fibrosis en su superficie, por lo que interfiere en el transporte de sustancias (Domínguez-Gil, 2012).

Asimismo, las microcápsulas intravasculares están asociadas con un mayor riesgo de trombosis, por ello, las más utilizadas son las extravasculares, que son implantadas vía subcutánea o en la cavidad peritoneal (Gurruchaga y cols., 2015).

2.1. Componentes de las microcápsulas

Los materiales seleccionados tienen que ser biodegradables (que se disuelvan o degraden en un periodo de tiempo admisible para la aplicación deseada) (Martín y cols., 2009) y biocompatibles (que cuando interactúen con los tejidos vivos no causen daño u originen escasas reacciones biológicas).

2.1.1. Recubrimiento externo

Para recubrir la microcápsula se recurre a poliaminoácidos insolubles en fluidos biológicos, que aportan resistencia mecánica y controlan la permeabilidad de los dispositivos. La poli-L-lisina, por ejemplo, se une con el alginato mediante interacción iónica, estabilizando así la matriz y reduciendo la porosidad de la microcápsula. Sin embargo, el polipéptido puede ser tóxico, por eso se estudian alternativas que puedan sustituirlo como: la poli-D-lisina, la poli-L-ornitina y la polimetilen-co-guanidina (Hernández y cols., 2011).





2.1.2. Matriz interna

Para la formación de la matriz de la microcápsula y por tanto, para la inmovilización celular, se recurre a las algas (*Laminaria hyperborea*, *Letonia nigrescens*, *Lessoniatrabeculata*,...), con el objetivo de obtener los polisacáridos (hidrogeles): alginato, agarosa, colágeno, ... (Pedraz y Orive, 2004; Hernández y cols., 2010), ya que presentan una baja tensión superficial con los componentes biológicos (la adsorción de proteínas y de células se reduce), y no inducen al rechazo por parte del sistema inmune. También forman una estructura tridimensional al polimerizarse, que sirve de base de cultivo para las células e impide su aglomeración y los posibles efectos de hipoxia y necrosis celular (Hernández y cols., 2011).

Como anteriormente se menciona, la microcápsula puede constar del polímero alginato, constituido por los monómeros ácidos α -L-gulurónico (G) y β -D-manurónico (M), que están unidos por enlaces glucosídicos α y β (1 \rightarrow 4). Los dispositivos también pueden formarse por una mezcla de alginatos de distintas especies, que logran la proporción idónea de los monómeros: GG (contribuyen a la rigidez del hidrogel), MM (mantienen la resistencia a la fractura), y GM. Esto permite obtener una elasticidad adecuada y una baja viscosidad de la solución, con la finalidad de conseguir una apropiada manipulación e inmovilización celular (Hernández y cols., 2010). Además, es posible incluir en la molécula de alginato residuos (arginina-glicina-ácido aspártico o tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina), que incrementan la viabilidad y capacidad de adhesión de las células implantadas, su multiplicación y diferenciación (Hernández y cols., 2011). Por otra parte, para que haya una interacción específica entre el polímero y las células modificadas genéticamente, se utilizan ligandos para receptores de superficie de las células. Estos ligandos (que están unidos al polímero por el extremo amino-terminal o carboxi-terminal), son péptidos que comprenden la secuencia RGD y que proceden de moléculas de adhesión celular (las cuales interaccionan con la matriz extracelular): las selectinas, las caderinas, las integrinas, ... (Hernández y cols, 2010).

El diseño de los dispositivos está realizado de forma que, una vez la terapia haya terminado, desaparezcan del organismo. Esto se consigue con la inducción, por parte de las células encapsuladas, de la secreción de la enzima alginato liasa, la cual degrada el polímero y causa la ruptura de las microcápsulas (Figura 4); posteriormente se produce la apoptosis de las células terapéuticas. De esta manera, aumenta la seguridad; disminuyen los efectos no deseados del tratamiento; evita la extirpación



quirúrgica de las microcápsulas y consigue que el tejido fibrótico alrededor de estas sea mínimo.

La alginato liasa se encuentra presente en bacterias (*Pseudoalteromonas elyakovii*), algas y moluscos marinos. Esta enzima despolimeriza el alginato por la reacción β -eliminación de los monómeros de ácido gulurónico y ácido manurónico (Team Slovenia, 2012).

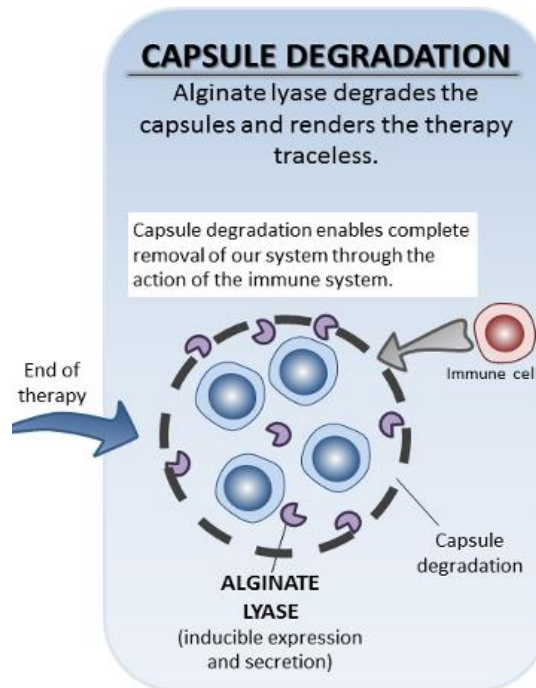


Figura 4. Degradación de la microcápsula por la actividad de la alginato liasa.

Fuente: modificado de <http://2012.igem.org/Team:Slovenia/SafetyMechanismsMicrocapsuleDegradation/>.

2.1.3. Contenido

En el interior de las matrices se pueden implantar numerosas líneas y tipos celulares de interés (Tabla), que se pueden modificadar genéticamente para controlar la secreción de la proteína requerida y la multiplicación celular (Hernández y cols., 2011; Pedraz y Orive, 2004).

Un sistema que está en ensayo clínico en fase I con linfocitos T, para prevenir la proliferación celular excesiva, es la inyección del gen suicida de la timidina quinasa en las células encapsuladas. Esta enzima es producida por el virus del herpes simple y cataliza la primera fosforilación del antiviral ganciclovir (el resto de fosforilaciones las realizan la guanilato quinasa y fosfoglicerato quinasa celulares). El ganciclovir trifosforilado se comporta como un sustrato de la ADN polimerasa, pero debido a que



carece de un grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo desoxirribosa, la unión fosfodiéster con el siguiente nucleótido no puede ser catalizada y, como consecuencia, se produce la inhibición de la proliferación celular y/o muerte por apoptosis (Martínez-Quintanilla, 2010; Gurruchaga y cols., 2015).

<i>Línea celular</i>	<i>Aplicación terapéutica</i>
Fibroblastos	Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas
Mioblastos	Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas
Células renales	Cáncer, hemofilia, SNC
Islotes de Langerhans	Diabetes
Células ováricas	Enfermedad de Fabry
Células paratifoideas	Hipoparatiroidismo
Hepatocitos	Transplante de hígado
Condriocitos	Regeneración de hueso y cartílago
Células de Leydig	Reemplazamiento hormonal
Células adrenales cromafines	Enfermedad de Parkinson, dolor crónico
Células madre	Regeneración de hueso, SNC, Enf. Endocrinas
PC12 feocromocitoma	Enfermedad de Parkinson
Mieloma	Factor de crecimiento hepático
Hibridoma	Cáncer, producción de anticuerpos
Células tumorales	Vacuna antitumoral, interleuquinas
Células de retina	Enfermedad de Parkinson
Células productoras de vectores virales	Cáncer
Bacterias	Eliminación de urea

Abreviaturas: Enf.: enfermedad.

Tabla . Ejemplos de líneas celulares microencapsuladas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas. Fuente: (Pedraz y Orive, 2004).

La monitorización de las células permite detectar si alguna microcápsula no ha sido eliminada del paciente al terminar el tratamiento. Gurruchaga y cols. realizan en este año 2015, la transducción del vector retroviral SFG_{NES}TGL en células de ratón. Este vector contiene tres genes reporteros que codifican: la timidina quinasa del virus del herpes simple I; la proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria* y la luciferasa de luciérnaga. El producto del primer gen se utiliza para interrumpir la terapia, y los de los otros dos genes permiten monitorizar “in vivo” las células encapsuladas mediante la técnica de luminometría (previa administración del sustrato de la enzima luciferasa, la D-luciferina) (Gurruchaga y cols., 2015).

2.2. Proceso de encapsulación

El gen de interés o el vector que lo contiene, se administra a las células por: electroporación, transfección, liposomas o vectores virales (adenovirus o retrovirus)





para posteriormente, encapsularlas en el interior del dispositivo. Por cada uno de estos hay entre $1-10 \times 10^6$ células por mL de solución del hidrogel.

El procedimiento de encapsulación se realiza a temperatura ambiente. Comprende varias etapas: primero, se suspenden las células modificadas genéticamente en una solución de alginato de sodio; se pasa la suspensión celular por un goteador para que caiga en forma de gotas sobre una solución de cloruro cálcico (Figura 5) y se produzca una gelificación instantánea de las mismas. De esta forma se obtienen perlas de alginato de calcio, las cuales bajo condiciones fisiológicas, son inestables; tienden a aumentar su permeabilidad, a hincharse por ósmosis y a romperse. Por este motivo, se les recubre de una capa policatiónica de poli-L-lisina durante 5 minutos. Como este polipéptido es inmunogénico, los dispositivos requieren de un último revestimiento con una solución de alginato durante 5 minutos, para formar microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) (Figura 6). Después estas se lavan con PBS y se transfieren a frascos de cultivo, donde se mantienen durante un mes (Hernández y cols., 2010; Gurruchaga y cols., 2015; Orive y cols., 2003).

Se determina la resistencia a la compresión de los dispositivos con un texturómetro, con el que se mide la fuerza requerida para generar una compresión del 70 % de las microcápsulas, con y sin contenido celular (los dispositivos vacíos poseen mayor resistencia que los que contienen células, debido a que en estos últimos las células alteran el núcleo de alginato (Ponce y cols., 2010.)). También se mide el diámetro de los dispositivos mediante un microscopio óptico invertido o se determina su tamaño por la técnica de difracción de rayos láser. Su morfología se puede observar por microscopía óptica y electrónica (Ponce y cols., 2010; Pérez, 2010).

Señalar que, el grado de gelificación a pH neutro depende de la hidratación del alginato, de la concentración de iones calcio y del contenido de bloques GG del polisacárido (Aguayo y cols., 2015). El gel se forma, porque los iones calcio desplazan a los iones sodio (que provienen de la sal de alginato), y porque se sitúan entre las cadenas lineales y paralelas del alginato, formando las estructuras denominadas “caja de huevos” (Figura 5). La estabilidad y resistencia de estas a pH neutro, se relaciona con lo bien que el catión encaja en los huecos que se forman entre los bloques del monómero ácido α -L-gulurónico (Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona, 2015; Avendaño-Romero, 2015).



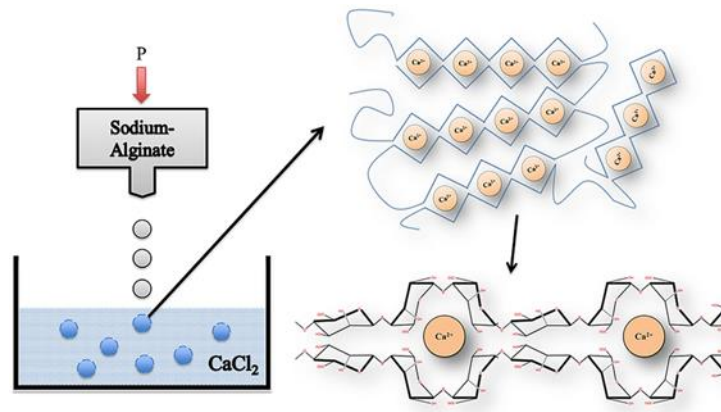


Figura 5. Proceso de gelificación del alginato de sodio y estructura en “caja de huevos” del alginato de calcio.

Fuente: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2014.00026/full>

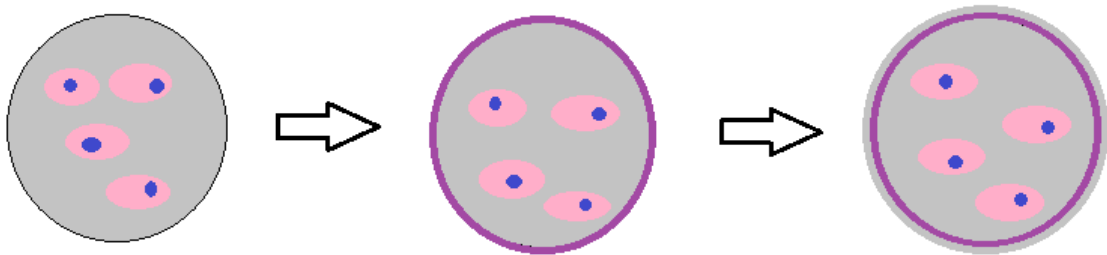


Figura 6. Proceso de encapsulación de las células.

Interpretación de los colores: rosa y azul (células nucleadas), gris (alginato), morado (poli-L-lisina).

2.3. Características específicas según su empleo

Particularidades de las microcápsulas utilizadas en los estudios que buscan una terapia para distintas enfermedades:

- Alzheimer: se suspendieron fibroblastos (transfectados para producir VEGF humano) en una solución de alginato al 1,5 %, que después se extruyó con cloruro de calcio 55 mM (pH 7,4), formando microperlas de alginato de calcio, las cuales se recubrieron con poli-L-lisina al 0,05% durante 5 min, y con una capa de alginato adicional otros 5 min. Se obtuvieron de 20 a 30 microcápsulas esféricas (diámetro de $405 \pm 11 \mu\text{m}$) con células, que se insertaron vía quirúrgica en la corteza cerebral de 15 ratones (Spuch y cols., 2010).

- **Cardiopatía isquémica:** se sometieron a modificación genética, células ováricas de un hamster de origen chino para secretar VEGF. Estas fueron resuspendidas en una solución de alginato de sodio esterilizada por filtración y se extruyeron en una solución de CaCl_2 100 mM, utilizando para ello, un goteador para formar perlas de gel de alginato de calcio. Las microperlas se incubaron al 0,05% de poli-L-lisina para formar la membrana de alginato-poli-L-lisina alrededor de la superficie. A continuación, para contrarrestar el exceso de cargas de la membrana, se añadió durante 5 min una solución de alginato al 0,15%. Finalmente, las microcápsulas semipermeables de APA, con células inmovilizadas en su interior, se cultivaron en un medio selectivo igual al de las células originales. Por otra parte, se prepararon microcápsulas vacías, sustituyendo la suspensión celular por una solución de alginato de sodio al 1,5%. Los dos tipos de dispositivos resultantes fueron de 200-250 μm de diámetro y se inyectaron, con una jeringa, en el interior del corazón infartado de dos grupos diferentes de ratas. También se creó otro grupo con células secretoras de VEGF sin encapsular (Zhang y cols., 2008).

- **Retinosis pigmentaria:** microcápsulas constituidas por un polímero que funciona como membrana externa semipermeable (con poros de 15 nm de diámetro) y por tereftalato de polietileno en su interior, para conservar las células humanas que contienen el gen CNTF activado, cuyo producto es liberado a través de las microcápsulas (Figura 7). Los dispositivos (1 mm de diámetro y 6 mm de largo) fueron implantados quirúrgicamente en un ojo de 10 voluntarios con pérdida de visión causada por la desaparición de los fotorreceptores de la retina (Sieving y cols., 2006).

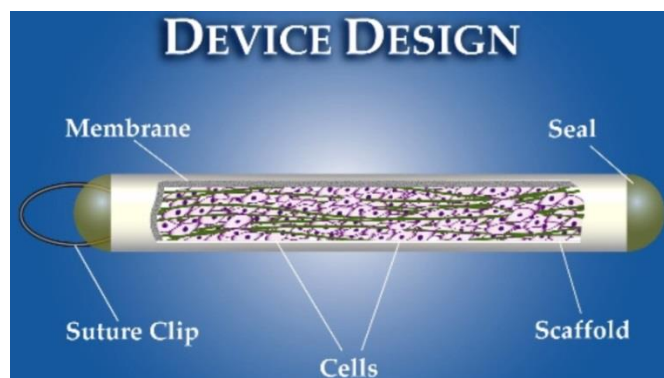


Figura 7. Dispositivo sellado por ambos extremos (con un clip de sutura en uno de ellos) y fabricado con plástico de grado médico. Consiste en una membrana externa semipermeable y una matriz interna que permite el crecimiento celular controlado y la producción continua de la proteína.

Fuente: <http://www.neurotechusa.com/ect-platform.html>



- **Atrofia geográfica:** en el tratamiento de la degeneración macular se hicieron dos transfecciones del gen que codifica el CNTF en dos líneas de células independientes, que sintetizaban dicha molécula a diferente velocidad. Estas, se inmovilizaron en cápsulas de 6 mm de largo y 1 mm de diámetro con una membrana externa polimérica semipermeable y con una matriz de tereftalato de polietileno. Los implantes se insertaron por cirugía, en el ojo de 51 pacientes, algunos de los cuales tenían microcápsulas que liberaban una dosis baja de CNTF (5 ng de proteína/día) y otros tenían microcápsulas que secretaban una dosis alta de la molécula (20 ng de proteína/día) (Zhang y cols., 2011).

2.4. Criopreservación

Una técnica de almacenamiento a largo plazo es la criopreservación, que se caracteriza por el uso de temperaturas muy bajas para preservar la estructura de las células encapsuladas intacta (Figura 8A y 8B). Estas se suspenden en una solución salina con uno o más crioprotectores, los cuales previenen la formación de cristales de hielo, reemplazando el agua de las células e incrementando la concentración total de los solutos. Las microcápsulas se congelan en nitrógeno líquido para ser almacenadas por un largo periodo de tiempo y cuando la muestra es requerida, se calienta rápidamente para que las células se recuperen de la congelación.

No obstante, el uso de crioprotectores está limitado debido al daño osmótico que originan en la célula por el influjo y exflujo de agua, así como el daño químico que causa la alta concentración intracelular de iones.

Actualmente se llevan a cabo dos métodos diferentes de enfriamiento, los cuales se eligen según el tipo de célula y el biomaterial de la microcápsula: el protocolo que usa un enfriamiento lento y bajas concentraciones de crioprotectores (Figura 8C y 8D), para minimizar la creación de hielo intracelular y la toxicidad que sufren las células por exposición a las sustancias anticongelantes; y el protocolo de vitrificación (Figura 8E y 8F), que lleva a cabo un enfriamiento rápido de la muestra y utiliza altas concentraciones de crioprotectores para evitar que se forme hielo. Este procedimiento permite que las células vitrificadas mantengan su capacidad de proliferación y diferenciación, y que las cápsulas no sufran daños en su estructura, por lo que es, a priori, el mejor método de criopreservación (Gurruchaga y cols., 2015).



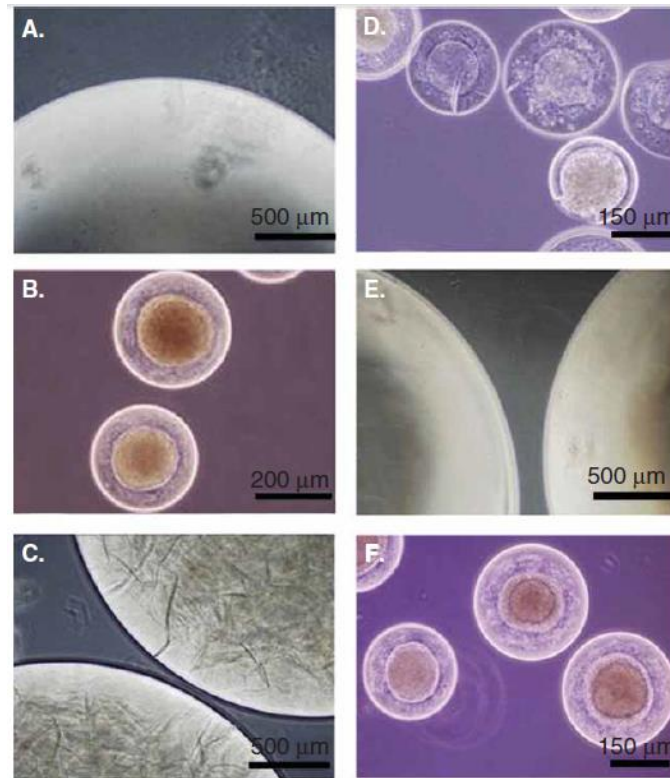


Figura 8. Morfología de las perlas de agarosa después del proceso de criopreservación y descongelación. (A) Perlas de agarosa control (no criopreservadas). (B) Microcápsula control con islotes de Langerhans. (C) Perlas enfriadas con el crioprotector DMSO. (D) Microcápsulas con islotes de Langerhans enfriadas con DMSO. (E) Perlas vitrificadas con solución de KYO-1. (F) Microcápsulas con islotes de Langerhans vitrificadas con KYO-1.

3. Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos en experimentos en los que se aplicó la tecnología basada en la microencapsulación celular:

- Alzheimer: se comprobó que el número de células viables dentro de las microcápsulas (Figura 9A), aumentó progresivamente, alcanzando su máximo después de 21 días (Figura 9B); paralelamente a esto, en la jornada siguiente a la encapsulación, la síntesis de VEGF era de 3006 ± 411 pg/100 mcap/día, y dos semanas después, era de 5485 ± 619 pg/100 mcap/día (Figura 9C). Los ratones, pasadas unas semanas, fueron sometidos a una craneotomía para tomar muestras de tejido de la corteza cerebral y así poder comprobar el aumento de la densidad vascular en la zona (Spuch y cols., 2010).

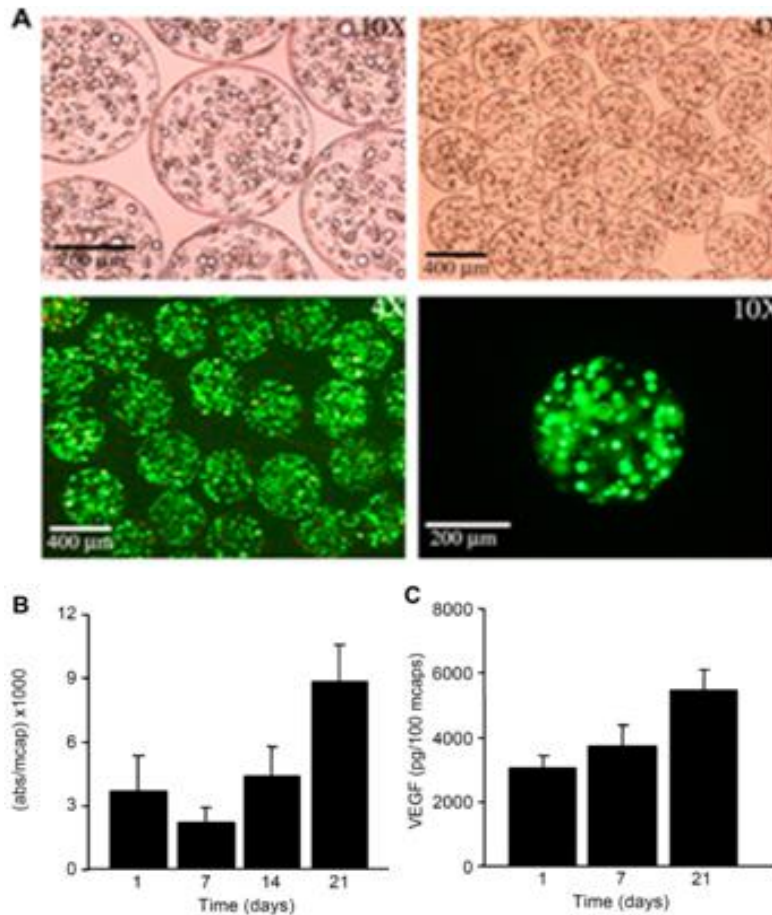


Figura 9. (A) Fibroblastos inmovilizados en el interior de microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato. Aumentos de x4 y x10. (B) Viabilidad de los fibroblastos microencapsulados secretando VEGF hasta la tercera semana “in vitro”. (C) Producción de VEGF de los fibroblastos microencapsulados (Datos expresados como una media \pm SD, n=5 por grupo).

Fuente: tomado de Spuch y cols., 2010.

- Cardiopatía isquémica: una semana después de la encapsulación, las células ocuparon casi todo el espacio disponible en la microcápsula y aumentaron progresivamente la secreción de VEGF hasta que mantuvieron un mismo nivel durante cuatro semanas (Figura). Fue entonces cuando las microcápsulas se implantaron en los corazones de las ratas (Figura 11A). Dos semanas después, los animales se mataron y se cogieron muestras de miocardio, encontrando que las células encapsuladas mantenían su estructura original y eran abundantes, también se vieron células inflamatorias y algo de fibrosis en el tejido circundante a las microcápsulas (Figura 11B). Siete días más tarde, se detectaron más neutrófilos y linfocitos alrededor y en el interior de los dispositivos (Figura 11C), indicando por tanto, una alta respuesta inflamatoria. Además, en las dos a tres semanas posteriores al trasplante (Figura 11D) se halló una alta densidad capilar. En el grupo de ratas que recibieron cápsulas vacías también había fibrosis, pero en menor cantidad que en el grupo que contenía cápsulas



con células. A las dos semanas, se detectaron anticuerpos anti-células modificadas genéticamente en todos los grupos, pero en menor medida en las ratas con cápsulas vacías y con las células encapsuladas. A la semana siguiente, estas últimas tenían casi los mismos niveles de inmunoglobulinas que las que recibieron células sin encapsular. (Zhang y cols., 2008).

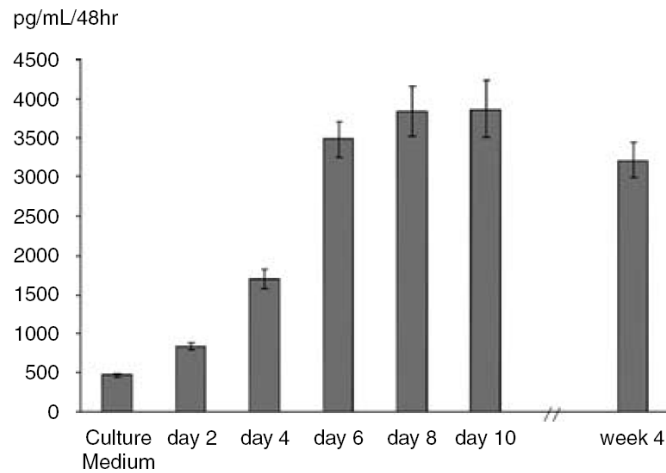


Figura 10. Concentración de VEGF a lo largo del tiempo.

Fuente: tomado de Zhang y cols., 2008.



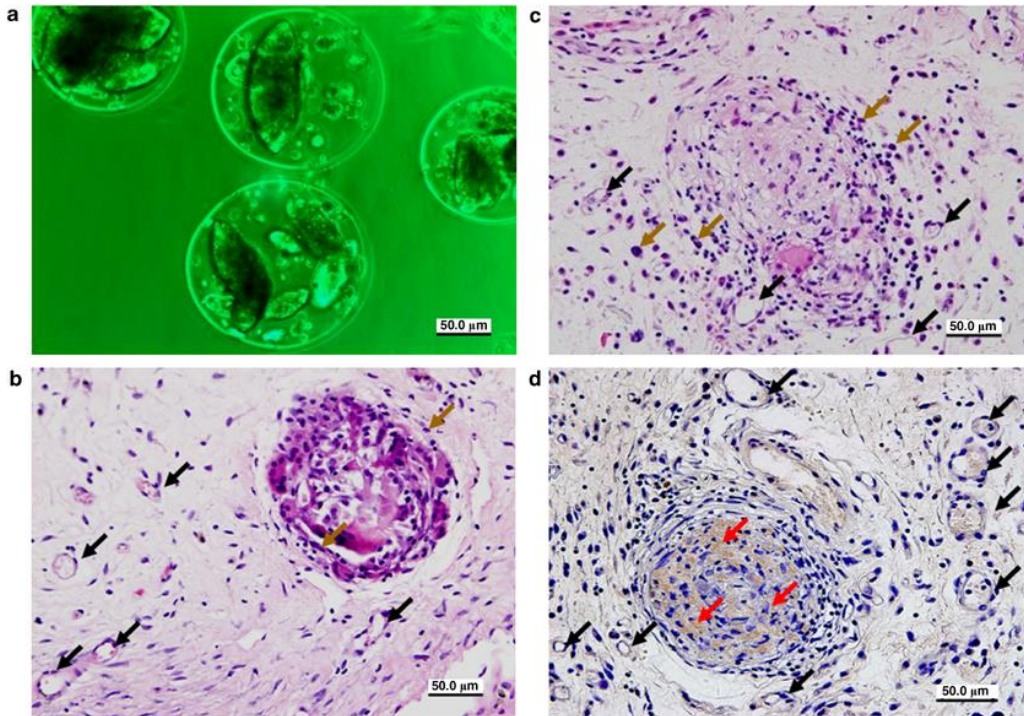


Figura 11. Microcápsulas con células del ovario de un hamster chino modificadas genéticamente para secretar VEGF antes y después de trasplantarlas en un corazón que había sufrido una isquemia (x40) (A) Células microencapsuladas antes de la implantación (microscopio invertido); (B) Dos semanas después del trasplante, se encontraron unas pocas células inflamatorias alrededor de la microcápsula (tinción de hematoxilina-eosina). (C) Tres semanas después del trasplante, se vieron muchas más células inmunitarias alrededor y dentro de las microcápsulas, indicando rechazo inmunológico del huésped; (D) Tres semanas posteriores al trasplante, se observó por tinción inmunohistoquímica la expresión del VEGF por parte de las células (microscopio óptico). *Interpretación de flechas:* las flechas negras indican vasos de pequeño calibre en la región tratada, las flechas marrones señalan células inflamatorias alrededor de la microcápsula y las flechas rojas apuntan células supervivientes del ovario de hámster en la microcápsula).

Fuente: tomado de Zhang y cols., 2008.

- **Retinosis pigmentaria:** los 10 implantes se examinaron inmediatamente después de ser retirados a los 6 meses (Figura 12). Al ser el tamaño del poro de la membrana del dispositivo de 15 nm de diámetro, los macrófagos de 10-20 μm no se vieron en la observación al microscopio de las muestras tomadas, pero sí se comprobó que había una mínima fibrosis alrededor de la zona del implante y que las microcápsulas todavía contenían células viables que excretaban niveles de CNTF iguales a los previamente obtenidos en perros con mutación *rcd1*, en los que se había llevado a cabo el mismo experimento. Cinco pacientes tuvieron un grado bajo de inflamación ocular en el área anterior del ojo y en uno de los participantes, dos semanas después de administrarle la dosis más baja de CNTF, se observó un desprendimiento coroideo superficial. Esta persona también desarrolló una catarata

nuclear 4-5 meses después de habersele retirado la cápsula. Otro paciente sufrió a los 6 meses una pequeña catarata subcapsular posterior, pero no afectó a su agudeza visual (Sieving y cols., 2006).

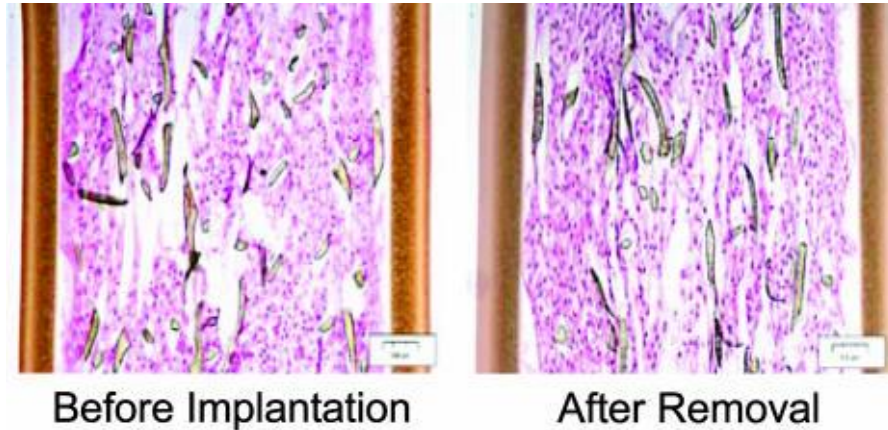


Figura 12. Histología de una sección longitudinal de una cápsula previa a su implantación y extraída a los 6 meses del ojo de un participante.

Interpretación de los colores: en rosa se observan células sintetizadoras de CNTF en ausencia de macrófagos y en amarillo se ve la matriz de tereftalato de polietileno. Se puede advertir que la densidad celular en la matriz, antes de la inserción y después de la extracción de las cápsulas del paciente, es prácticamente la misma. Secciones de 4µm de espesor embebidas en metacrilato de glicol y teñidas con hematoxilina y eosina. (Ampliación, x10).

Fuente: tomado de Sieving y cols., 2006.

- **Atrofia geográfica:** en los 12 meses de estudio de la cavidad vítrea, no se detectaron en el suero anticuerpos anti-CNTF o células que hubieran estado encapsuladas. Los sujetos con cantidades elevadas de microcápsulas secretoras de CNTF mostraron una tendencia hacia la estabilización de la agudeza visual al cabo de un año; 96,3% de los pacientes tratados perdieron menos de tres líneas de agudeza visual (15 letras), frente al 75% de los pacientes del grupo de tratamiento simulado (Figura 13A). En el análisis de un subgrupo de los pacientes con agudeza visual con línea de base en 20/63 o mejor, el 55,6% del grupo de pacientes con dosis baja/tratamiento simulado perdieron <15 letras, mientras que el 100 % de aquellos sometidos a dosis alta, perdieron <15 letras, dando una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,033$) (Figura 13B) (Zhang y cols., 2011).

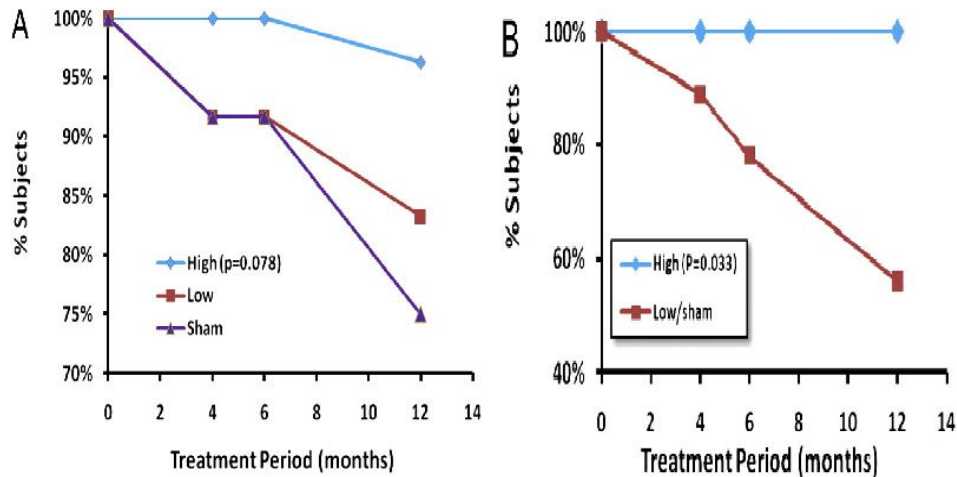


Figura 13. Efecto de la secreción intraocular de CNTF en la estabilización de la agudeza visual. (A) Porcentaje de sujetos que perdieron <15 líneas de agudeza visual durante 12 meses. (B) Efecto significativo del CNTF en la estabilización de la agudeza visual en el grupo con alta cantidad de microcápsulas y con línea de base en 20/63 o mejor.

Fuente: tomado de Zhang y cols., 2011.

4. Discusión

Se estudia la viabilidad y utilidad de las microcápsulas teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes experimentos:

- Alzheimer: el uso de la microencapsulación en el cerebro de ratón demostró tener éxito, puesto que tres meses después de la operación, la carga de A β se vio reducida. Por ello, puede ser considerado como tratamiento, el injerto de microcápsulas con células modificadas genéticamente para expresar productos terapéuticos, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Spuch y cols., 2010).

- Cardiopatía isquémica: las microcápsulas utilizadas en el corazón fueron capaces de tolerar la fuerza de compresión mecánica y la alta presión del tejido miocárdico. Se observó angiogénesis en la zona tratada del miocardio, lo cual se tradujo en una mejora funcional del mismo. La inmunogenicidad de las células xenogénicas se redujo después de la microencapsulación, aunque se originó un proceso de inflamación y fibrosis (al igual que en las ratas trasplantadas con las cápsulas vacías). Esto tuvo como consecuencia una disminución de la eficiencia de intercambio de sustancias entre las células microencapsuladas y el ambiente circundante. Con estos datos, se creyó que los factores responsables de estas respuestas eran la biocompatibilidad de los compuestos químicos de la microcápsula y la eficiencia a la hora de evitar la respuesta del sistema inmune. El hecho de que la



concentración de anticuerpos fuera casi la misma en el grupo con las células encapsuladas y sin encapsular, demuestra que el sistema inmune reconoció las células ováricas como extrañas. La posible ruptura de la microcápsula o el escape de antígenos solubles procedentes de las células trasplantadas, podría llevar a la detección de estas por parte del sistema inmune. Esto permite deducir que una membrana semipermeable puede retrasar, pero no impedir completamente, el rechazo inmunitario.

Señalar que no es posible eliminar las microcápsulas implantadas en el corazón. Sin embargo, podrían utilizarse materiales en la fabricación de estos dispositivos que se disolvieran lentamente, haciendo que las células xenogénicas fueran digeridas eventualmente por los macrófagos del huésped.

Esto sugiere que la implantación de células microencapsuladas y secretoras de VEGF puede ser una terapia para enfermos de cardiopatía isquémica, ya que permanecen funcionales en el corazón e intactas por parte del sistema inmune por al menos unas semanas (Zhang y cols., 2008).

- Retinosis pigmentaria: el hecho de que, 4-5 meses después de la retirada del implante, el ojo de uno de los participantes desarrollara una catarata nuclear, se interpretó como un efecto secundario de las heridas causadas por la cirugía, más que por los efectos del CNTF. Este ensayo demuestra la seguridad y la utilidad de esta tecnología como método de administración de proteínas terapéuticas para el ojo. Asimismo, estos implantes proporcionan una liberación terapéutica a largo plazo (Figura 14) que facilita los estudios de eficacia del tratamiento en las enfermedades neurodegenerativas de la retina en general y particularmente en las maculares (Sieving y cols., 2006).

- Atrofia geográfica: los resultados obtenidos demuestran que la tecnología de microencapsulación celular es adecuada para la administración del CNTF a largo plazo. Y que esta molécula es beneficiosa para el mantenimiento de la visión, puesto que retrasa la desaparición de las células fotorreceptoras durante la atrofia geográfica (Zhang y cols., 2011).



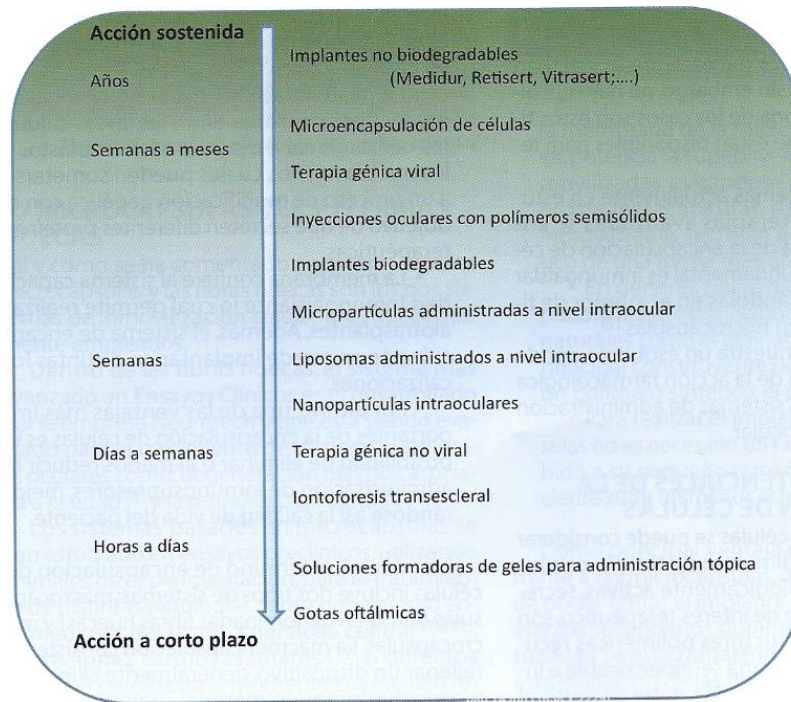


Figura 14. Duración de la acción farmacológica utilizando diferentes sistemas de administración de fármacos a nivel ocular.

Fuente: Hernández y cols., 2011.

Como se deduce de los apartados anteriores, esta tecnología lleva décadas en los laboratorios, siendo probada en ensayos clínicos con animales y humanos para obtener un mejor conocimiento de las señales celulares de diferenciación, proliferación y migración; del funcionamiento del sistema de defensa del paciente (Domínguez-Gil, 2012), y de los materiales que mayor biocompatibilidad y bioseguridad presentan para ser utilizados en la fabricación de las microcápsulas. En la actualidad, aún no está autorizado su uso como remedio para distintas patologías, puesto que ninguna investigación con microcápsulas está en ensayo clínico en fase IV.

El mayor problema que presentan las microcápsulas a corto plazo es la inflamación que se genera en su lugar de inserción por los procesos de regeneración del tejido dañado a causa de la cirugía. También a largo plazo está la generación de fibrosis alrededor de los dispositivos, que causa hipoxia en las células encapsuladas debido a la obstrucción de los poros que poseen las microcápsulas.

En cuanto a las características de las microcápsulas, es habitual el uso de aquellas con un diámetro entorno a 1 mm y con una matriz interna de alginato cálcico (por sus características intrínsecas y por su facilidad de obtención). No obstante, se ha visto que las cápsulas producidas por gelificación iónica con calcio tienen una supervivencia limitada a largo plazo. Por eso, se ha investigado el reemplazo del calcio



por el bario, ya que las microcápsulas construidas con este ión tienen mayor estabilidad mecánica; el bario, en bajas concentraciones en la solución gelificante, disminuye el hinchamiento por ósmosis que sufren los dispositivos y además, la generación de cápsulas de alginato de bario no necesita la adición de la permeabilidad selectiva de la poli-L-lisina (Pérez, 2010). También se ha valorado el uso de polietilenglicol (PEG) como material para la matriz, puesto que mejora la resistencia de las microcápsulas a los cambios fisiológicos, aunque no aumenta la resistencia mecánica. Spasojevic y cols. en el año 2014, descubrieron que el enmascaramiento de la poli-L-lisina de los dispositivos con este poliéter reduce la respuesta proinflamatoria causada por los mismos (Gurruchaga y cols., 2015).

Las microcápsulas pueden ser administradas (con una dosis de entre 0,01 y 100 mg por Kg de peso corporal) vía oral, tanto en cápsulas de mayor tamaño (patologías del colon), como en forma de soluciones estériles o suspensiones; vía nasal y vía intradérmica (Martín y cols., 2009). Se realizaron ensayos en los que los dispositivos se insertaron vía quirúrgica (Alzheimer, retinosis pigmentaria y atrofia geográfica) o vía inyección (cardiopatía isquémica). Por tanto, según el lugar de implantación de los mismos se usa un medio u otro de administración.

Las células encapsuladas proporcionan una alternativa para los medios de tratamiento convencionales, ya que la modificación genética de las células proporciona una amplia variedad de moléculas terapéuticas (Sieving y cols., 2006). Además, el aislamiento inmunológico (corto-largo plazo) del contenido del dispositivo hace posible el trasplante de células no humanas, lo cual resulta beneficioso por la limitada disponibilidad de donantes de tejidos humanos (Gurruchaga y cols., 2015).

El poder almacenar las microcápsulas por la técnica de criopreservación permitiría clasificar las mismas según sus características y el producto terapéutico que liberasen, para tener estos dispositivos listos para su administración a los pacientes. Sin embargo, la traslación de esta tecnología del laboratorio a la cabecera del paciente requeriría estandarizar y definir los protocolos de encapsulación de células para minimizar las diferencias entre laboratorios y así aumentar su producción en fábricas (Gurruchaga y cols., 2015).





4.1. Conclusiones

Antes de la utilización de células microencapsuladas en la clínica, es necesario investigar materiales que originen una nula respuesta inmunitaria, con el fin de que no se genere fibrosis alrededor de los dispositivos y por lo tanto, impida la secreción del fármaco.

La tecnología de microencapsulación tiene un futuro prometedor, ya que está probado que es útil como terapia para enfermedades que afectan a distintos órganos y como método para liberar, a largo plazo y de forma controlada, fármacos.





5. Bibliografía

1. Aguayo, R., Contreras, M., Hernández, B. y D., Vázquez. (2015) "Gelificación de Alginatos" en Academia de Ciencias de Morelos, A.C. [En línea], pp 1-3. Disponible en: <http://www.acmor.org.mx/sites/default/files/223.%20Alginatos.pdf> [Accesado el día 23 de mayo de 2015].
2. Avendaño-Romero G., López-Malo A. y E. Palou. (2015) "Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos" en Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Volumen 7. 2013, pp 87-96.
3. De Vos, P., De Haan, B. y R. Van Schilfgaarde. "Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules" en *Biomaterials*. Volumen 18. 1997, pp 273-278.
4. Domínguez-Gil, A. (2012) "Terapias avanzadas y desarrollo farmacéutico". *Discurso inaugural del año académico 2012*. Real Academia de Medicina de Salamanca, 2012, Salamanca, pp 5-82.
5. Espinosa, C. (2015) "¿Qué es la cardiopatía isquémica o enfermedad coronaria?" en *About.com* [En línea]. Disponible en: <http://enfermedadescorazon.about.com/od/tipos-enfermedades-corazon/a/Que-Es-La-Cardiopatia-Isquemica-O-Enfermedad-Coronaria.htm> [Accesado el día 28 de enero de 2015].
6. Fácila, L. (2015) "Cardiopatía isquémica: infarto y angina" en *Fundación Española del Corazón* [En línea]. Disponible en: <http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/cardiopatia-isquemica.html> [Accesado el día 28 de enero de 2015].
7. Gurruchaga, H., Saenz Del Burgo, L., Ciriza, J., Orive, G., Hernández, R.M. y J.L. Pedraz. "Advances in cell encapsulation technology and its application in drug delivery" en *Expert Opinion on Drug Delivery*. Enero 2015, pp. 1–17.
8. Hernández, R.M., Orive, G. y J.L. Pedraz. 2011. "Utilización de la microencapsulación de célula en terapias avanzadas: ¿una alternativa para terapia ocular?" en *Visión*. Volumen 39, pp. 23-30.
9. Hernández, M.R.M., Orive, A.G., Spuch, C.C., Antequera, T.D., Bermejo-Pareja, F., Carro, D.E. y J.L. Pedraz. 2010. "Empleo de micropartículas que comprenden células modificadas genéticamente en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas". Pat. ref: WO2010010223 A1.





10. Hubbell, J. A., Pathak, C.P., Sawhney, A.S., Desai, N.P., Hill, J.L. y S.F.A. Hossainy. 2004. "Geles para encapsulación de materiales biológicos". Pat. ref: ES2220906 T3.
11. López-Molina, D., Chazarra, S., How, C.W., Pruidze, N., Navarro-Perán, E., García-Cánovas, F., García-Ruiz, P.A., Rojas-Melgarejo, F. y J.N. Rodríguez-López. "Cinnamate of inulin as a vehicle for delivery of colonic drugs" en *International Journal of Pharmaceutics*. Volumen 479. Febrero 2015, pp. 96–102.
12. Martín, R.M., Olaechea M. y J.L. Muñoz. 2009. "Empleo de micropartículas para su uso como vacunas y la liberación de moléculas biológicamente activas". Pat. ref: WO2009063116 A1
13. Martínez-Quintanilla, J. (2010) *Selección positiva de células modificadas con genes suicidas como estrategia terapéutica contra el cáncer*. Tesis de grado. Barcelona. Departament de Biología cel.lular, inmunología y neurociències. Universitat de Barcelona.
14. Orive, G., Pedraz, J.L. y R.M. Hernández. 2009. "Micropartículas de alginato modificado con RGD como sistema de liberación de fármacos". Pat. ref: WO 2009000955 A1.
15. Orive, G., Gascón, A.R., Hernández, R.M., Igartua, M. y J. L. Pedraz. "Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges" en *Trends in Pharmacological Sciences*. Volumen 24. Mayo 2003, pp. 207–210.
16. Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Igartua, M. y J.L. Pedraz, "Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules" en *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volumen 18. Enero 2003, pp 23–30.
17. Pedraz, J.L. y G. Orive. "La microencapsulación de células. ¿Una nueva alternativa terapéutica?" en *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Volumen 70. 2004, pp 777-787.
18. Pérez, E. (2010) *Desarrollo y modelización de una técnica de producción de microcápsulas con aplicaciones en biomedicina*. Tesis de grado. Salamanca. Departamento de Ingeniería química y textil. Universidad de Salamanca.
19. Ponce, S., Gorka, O., Hernández, R., Rodríguez, A., Igartua, M. y J.L. Pedraz. "Efecto del polimerización en la viabilidad celular y la estabilidad mecánica de microcápsulas de alginato" en *Sociedad española de farmacia industrial y galénica*. [En línea]. 2010, pp 99-101. Disponible en: http://www.sefig.com/doc/Congreso%20Granada/TF/026_TF.pdf [Accesado el día 4 de abril de 2015].





20. Sakata, N., Sumi, S., Yoshimatsu, G., Goto, M., Egawa, S. y M. Unno. "Encapsulated islets transplantation: Past, present and future" en *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. Volumen 3. Febrero 2012, pp 19–26.
21. Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J.S., Fullmer, K.R y R.A. Bush. "Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: Phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants" en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Volumen 103. Enero 2006, pp 3896–3901.
22. Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R.M., Molina, J.A., Bermejo-Pareja, F., Pedraz, J.L. y E. Carro. "The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease" en *Biomaterials*. Volumen 31. Julio 2010, pp 5608–5618.
23. Zhang, H., Zhu, S.J., Wang, W., Wei, Y.J. y S.S Hu. "Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function" en *Gene Therapy*. Volumen 15. Enero 2008, pp 40–48.
24. Zhang, K., Hopkins, J.J., Heier, J.S., Birch, D.G., Halperin, L.S., Albini, T.A., Brown, D.M., Jaffe, G.J., Tao, W. y G.A. Williams. "Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration" en *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Volumen 108. Abril 2011, pp 6241–6245.

5.1. Enlaces interesantes

25. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (2015) "Biotecnologia. Reaccions químiques amb microorganismes" [En línea], pp 1-4. Disponible en: http://www.etsuib.upc.edu/docs/activitats_difusi/biotecnologia_-_dossier.pdf [Accesado el día 28 de febrero de 2015].
26. Team Slovenia (2012) "Microcapsule degradation" [En línea]. Disponible en: <http://2012.igem.org/Team:Slovenia/SafetyMechanismsMicrocapsuleDegradation> [Accesado el día 28 de febrero de 2015].

