



TRABAJO FIN DE GRADO

**MICROESFERAS
POLIMÉRICAS PARA
TRATAMIENTO LOCAL**

Departamento de Ingeniería Química y
Tecnología Farmacéutica

Cristian Mateo León
Tutora: Carmen María Évora García
Cotutora: Araceli Delgado Hernández
Grado en Farmacia
Curso 2019/2020

Resumen	3
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos	
3.1. Materiales	8
3.2. Preparación de tampón fosfato	8
3.3. Método de valoración de la goserelina	8
3.3.1. Preparación de la recta de calibrado de la goserelina y la albúmina	9
3.4. Preparación de las microesferas	10
3.4.1. Procedimiento	10
3.5. Evaluación de la capacidad de encapsulación de las microesferas	11
3.5.1. Procedimiento	11
3.6. Evaluación de los perfiles de liberación	12
3.6.1. Procedimiento	12
4. Resultados	
4.1. Puesta a punto del método de valoración de la goserelina por microBCA. Recta de calibrado de la goserelina y la albúmina	13
4.2. Relación entre goserelina y albúmina	14
4.3. Capacidad de encapsulación	14
4.4. Perfiles de liberación	14
5. Discusión	17
6. Conclusiones	19
7. Bibliografía	20

Resumen

Los sistemas de liberación controlada permiten modular la cinética de cesión de los fármacos consiguiendo efectos terapéuticos a dosis bajas, asegurando su eficacia y seguridad. En este trabajo proponemos elaborar microesferas de goserelina para su administración local en miomas uterinos, con el objetivo de reducir estos tumores evitando los efectos secundarios derivados de la administración sistémica. Las microesferas se prepararon por el método de doble emulsión utilizando como polímero el poliláctico-co-glicólico (PLGA). Además, se incorporó alginato en la fase acuosa interna de una de las formulaciones para explorar su papel sobre la capacidad de encapsulación y el perfil de liberación de la proteína. A diferencia de lo esperado, la formulación sin alginato presentó mejores resultados en ambas situaciones.

No obstante, los resultados preliminares relativos a los perfiles de liberación podrían ser muy útiles para continuar con los estudios *in vivo* e *in vitro* que requiere el desarrollo de estas preparaciones. La formulación sin alginato liberaría la totalidad de la dosis encapsulada en un mes, resultando apropiada para posteriores ensayos *in vivo*. Por su parte, la formulación con alginato podría ensayarse en modelos *in vitro* que permanecen viables una semana, tiempo que tarda en cederse la goserelina desde estas microesferas.

Abstract

Controlled drug delivery systems allow to modulate release kinetics achieving therapeutic effects at low doses, ensuring efficacy and safety. In this work, we propose to develop goserelin microspheres for local administration in uterine fibroids, with the aim of avoiding the side effects derived from systemic administration. Microspheres were prepared by the double emulsion method using polylactic-co-glycolic (PLGA) as polymer. In addition, alginate was incorporated into the internal aqueous phase of one of the formulations to explore its role in the encapsulation capacity and release profile of the protein. Unlike expected, alginate-free formulation presented better results in both situations.

However, these preliminary results concerning the release profiles could be useful to continue with *in vivo* and *in vitro* trials required for the development of these preparations. Alginate-free formulation would release the entire encapsulated dose in one month, making it suitable for subsequent *in vivo* testing. On the other hand, alginate formulation could be tested on *in vitro* models that remain viable for a week, the goserelin release time from these microspheres.

1. Introducción

El uso de sistemas para la liberación controlada de fármacos ha supuesto un importante avance en la administración de aquellos que tienen importantes problemas para ser eficaces utilizando las formas farmacéuticas convencionales. De esta manera, fármacos de especial interés terapéutico pueden ver aprovechadas sus características y conseguir administraciones prolongadas que permitan mantener las concentraciones terapéuticas de forma sostenida en el tiempo.

En la actualidad, diversos péptidos y proteínas se han revelado como moléculas ideales para incorporar a estos sistemas de liberación, ya que permiten explotar su alta actividad y especificidad, baja toxicidad y función biológica definida, minimizando en gran parte los problemas asociados a sus características fisicoquímicas intrínsecas, alto peso molecular, pobre capacidad de penetración a través de membranas biológicas y baja biodisponibilidad¹.

Una de las proteínas que puede verse beneficiada de estas técnicas es la goserelina. Este pequeño péptido, constituido por diez aminoácidos y de aproximadamente 1270 Da, presenta una alta hidrosolubilidad, estabilidad química y física *in vitro*², además de un marcado carácter catiónico debido a la presencia de numerosos grupos amino en su estructura. En las presentaciones disponibles en el mercado, aparece principalmente en forma de acetato, bajo la denominación comercial Zoladex®, utilizado como inyección subcutánea de administración mensual o trimestral³.

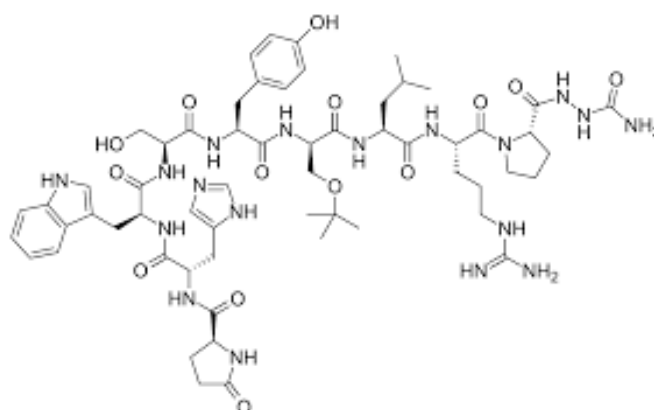


Figura 1. Estructura molecular de la goserelina.

La goserelina es un análogo sintético agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en reproducir las acciones de la GnRH natural. Esta hormona, liberada desde el hipotálamo, estimula los receptores en la

glándula pituitaria, que luego liberan la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH)⁴.

Así, la goserelina inhibe la secreción de estas hormonas por retroalimentación uniéndose a la mayoría de los receptores hipofisarios de la GnRH. Como consecuencia, se consigue privar de testosterona o estrógenos a los tumores hormonalmente dependientes. Este mecanismo ha permitido la utilización de este fármaco en diversos tipos de cáncer, como el cáncer de próstata, en el que ha demostrado prolongar la vida de los pacientes tras haber recibido radioterapia, y en el cáncer de mama, utilizado como tratamiento adyuvante en pacientes premenopáusicas, logrando el mismo efecto que la quimioterapia⁵.

Sin embargo, la indicación en la que nos centraremos en nuestra investigación es en el tratamiento de los miomas uterinos. Actualmente, esta enfermedad es considerada la neoplasia ginecológica benigna más común. Aparece principalmente en mujeres de entre 30 y 50 años y de forma más prevalente en las mujeres afroamericanas⁶. Comparativamente, las mujeres afroamericanas desarrollan miomas a una edad más temprana y tienen tumores más numerosos y sintomáticos que las caucásicas⁷.

Habitualmente el tratamiento es quirúrgico, mediante histerectomía (extraer el útero) o miomectomía (extraer el mioma). Sin embargo, la evidencia científica ha demostrado la relación entre la aparición de los miomas y la producción de estrógenos, ya que éstos se encuentran sobreexpresados en el mioma durante todo el ciclo menstrual⁸, no sólo en la fase secretora, como ocurre en el miometrio normalmente. Así, queda de manifiesto el ambiente hiperestrogénico presente en los miomas, lo que podría suponer una alternativa de tratamiento empleando fármacos que actúan sobre esa vía. De esta manera, los análogos de GnRH han supuesto un avance en el tratamiento de esta enfermedad, ya que consiguen importantes reducciones de los tumores⁹ y son ampliamente utilizados como tratamiento previo a la cirugía.

Sin embargo, la administración sistémica prolongada de estos fármacos produce problemas típicos de la menopausia, tales como sofocos o disminución de la densidad ósea. Actualmente, se ha demostrado que los miomas expresan receptores para GnRH, lo que permitiría su reducción mediante tratamiento local¹⁰. Utilizando esta vía, ya sea mediante una inyección transabdominal o transvaginal, se podría retrasar o evitar la cirugía y los riesgos asociados a su carácter invasivo. Además, esta terapia permite reducir significativamente los efectos adversos asociados a los análogos de GnRH, especialmente las menorragias y el riesgo de infertilidad, logrando una importante mejora en la calidad de vida de las pacientes. Como consecuencia, el elevado coste sanitario asociado a estos tratamientos se vería ampliamente reducido, lo que

supondría un importante avance, principalmente en países subdesarrollados dotados de escasos recursos donde el acceso a estas terapias es habitualmente difícil¹¹.

Profundizando en las formulaciones para terapia local, encontramos que la utilización de microesferas poliméricas supone en la actualidad una interesante opción para desarrollar sistemas para la liberación controlada de fármacos. Para su elaboración se utilizan diferentes polímeros, entre los que destacan los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico. Generalmente, el fármaco está distribuido en la matriz polimérica y es liberado por dos mecanismos fundamentales: difusión a través de la matriz y degradación del polímero, que lleva a la erosión de las partículas¹².

Además, estos sistemas pueden formularse en combinación con otros polímeros que permitan mejorar la capacidad de encapsulación y/o modificar los perfiles de liberación. A modo de ejemplo, nos encontramos con el polisacárido natural alginato, constituido por cantidades variables de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico. Sus características físicas podrían ser aprovechadas para mejorar la difusión y evitar la degradación de las proteínas una vez se encuentran en el organismo. Previamente, el alginato necesita sufrir un proceso de reticulación por gelación iónica simple, en el que cationes divalentes (generalmente se emplea el Ca^{2+} , aunque también el Sr^{2+} y el Ba^{2+}) interactúan con las unidades de ácido gulurónico formándose puentes iónicos entre cadenas de alginato adyacentes¹³.

Finalmente, se han desarrollado diferentes técnicas para la microencapsulación, dependiendo de la naturaleza del fármaco. Aquellos con marcado carácter hidrofóbico presentan encapsulaciones efectivas utilizando el método de emulsión simple. Sin embargo, para péptidos o pequeñas proteínas, como la goserelina, altamente hidrosoluble, es habitual utilizar diferentes procedimientos, entre los que destacan la coacervación, el secado por pulverización, la atomización por ultrasonidos y el método de doble emulsión con evaporación del disolvente¹⁴.

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio consiste en desarrollar nuevas formas de liberación prolongada para la administración local de goserelina, con el fin de reducir la dosis de fármaco y en definitiva mejorar su eficacia y seguridad en el tratamiento de los miomas. Para ello, proponemos la elaboración de microesferas poliméricas por el método de doble emulsión con evaporación del disolvente utilizando PLGA como polímero.

Teniendo en cuenta este objetivo general, los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Puesta a punto del método de valoración de la goserelina por microBCA.
- Puesta a punto del método de elaboración de microesferas por la técnica de doble emulsión.
- Teniendo en cuenta el carácter aniónico del alginato y la carga positiva de la goserelina, explorar el papel que juega la presencia de este polímero en la fase interna acuosa para mejorar el rendimiento de encapsulación, así como su efecto en la cinética de liberación de este péptido.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

- Reactivos para preparar el tampón fosfato: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 (Merck, Estados Unidos)
- Micro BCA TM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Estados Unidos)
- DCM (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- PLGA Resomer® RG858S (lactide: glycolide 85:15; Evonik, Alemania)
- PLGA Resomer® RG755S (lactide: glycolide 75:25; Evonik, Alemania)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- PVA (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Protanal LF10/60 FT (Alginato sódico: viscosidad 1% 20°C 44 mPa.s; FMC Biopolymer, Noruega)
- NaCl (Merck, Estados Unidos)
- Seroalbúmina bovina (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Acetato de Goserelina (Sigma Aldrich, Estados Unidos)

3.2. Preparación de Tampón fosfato.

Se decidió utilizar tampón fosfato pH 7,4 como medio para preparar las disoluciones patrones de goserelina ya que es el medio empleado en los ensayos de liberación, al imitar las condiciones fisiológicas.

El tampón fosfato utilizado se preparó según especifica el “Documenta Geigy Tablas Científicas”¹⁵. Para preparar 1 L, se utilizaron 800 ml de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 66,7 mM y 190 ml de la solución de KH_2PO_4 66,7 mM. A continuación, tras el correcto calibrado del pHmetro (GLP21, Crison, Estados Unidos), se midió el pH y ajustó empleando la solución necesaria hasta alcanzar el pH requerido de 7,4.

3.3. Método de valoración de la goserelina

La goserelina se analiza por el método denominado microBCA, basado en el método de Lowry, un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración, según la ley de Lambert-Beer¹⁶. En el Kit empleado de la casa comercial Thermo Scientific se utiliza el ácido bicinónico (BCA) como reactivo de

detección. Se forma un producto de reacción de color púrpura por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}) que presenta fuerte absorbancia a 562 nm.

Normalmente se utiliza la seroalbúmina bovina (BSA) como referencia para elaborar la recta de calibrado y para calcular la relación entre la absorbancia de la proteína a valorar y la obtenida a concentraciones equivalentes de albúmina. Esta relación se utiliza como factor de corrección para calcular la concentración de la proteína problema. Sin embargo, como es habitual que haya cierta variabilidad en la respuesta colorimétrica de las proteínas, hemos realizado también la recta de calibrado con disoluciones patrón de la goserelina para intentar alcanzar la máxima precisión.

3.3.1 Preparación de la recta de calibrado de la goserelina y la albúmina

La preparación de las rectas de calibrado y su cuantificación se realizó según el siguiente protocolo:

1. Las disoluciones patrones tanto de goserelina como de BSA se preparan en tampón fosfato en un intervalo de concentraciones de 1-200 $\mu\text{g/ml}$.
2. El tampón fosfato se utiliza como blanco (0 $\mu\text{g/ml}$).
3. Una vez realizadas las diluciones, se pipetea 150 μl de cada dilución por triplicado en pocillos de placas de 96 pocillos.
4. De forma inmediata se añade el reactivo de trabajo preparado de acuerdo con el protocolo de microBCA (ThermoFisher Sci, Estados Unidos). De esta manera, los componentes del kit se mezclan como sigue: 25 partes del reactivo A (tampón tartrato-carbonato alcalino), 24 partes del reactivo B (solución de ácido bicinonínico) y 1 parte del reactivo C (solución de sulfato de cobre).
5. La mezcla se incuba a 37 °C durante dos horas. Tras este periodo, se deja enfriar la placa y se determina la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Biotek, Estados Unidos).

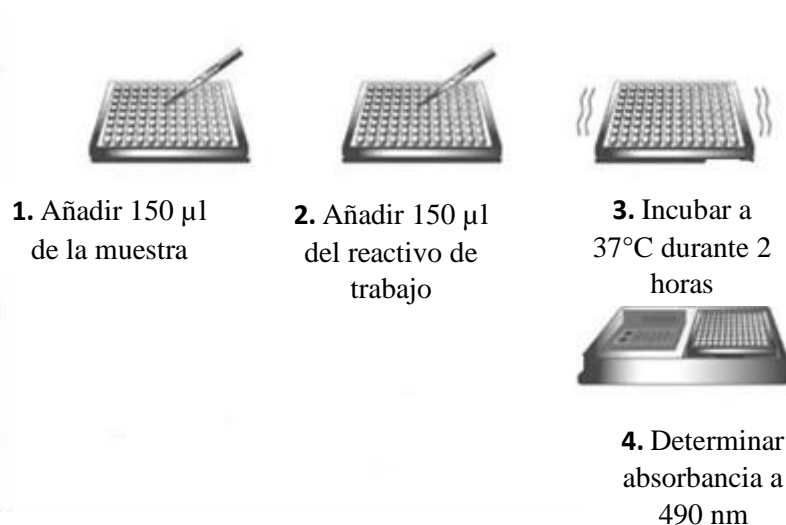


Figura 2. *Etapas del método de valoración de la goserelina y BSA por microBCA.*

3.4. Preparación de las microesferas.

Elaboramos dos formulaciones de microesferas mediante el método de doble emulsión (W/O/W) siguiendo un procedimiento previamente descrito¹⁷. La fase oleosa (O) es idéntica para las dos formulaciones. Se preparó a una concentración de 125 mg/ml, utilizando 250 mg de una mezcla de dos polímeros en proporción 75:25 (200 mg de Resomer RG755 y 50 mg de Resomer RG858S) en 2 ml de DCM en un frasco de vidrio curvo.

La fase acuosa interna (W_1) supone la principal diferencia entre las formulaciones:

Formulación 1: 100 μ l de PVA al 15% + 300 μ g de goserelina + 300 μ l agua

Formulación 2: 100 μ l de PVA al 15% + 300 μ g de goserelina + 300 μ l de alginato al 6%

La fase acuosa externa (W_2) consistió en 5,2 ml de una disolución acuosa de PVA al 5 %, NaCl al 5 % y CaCl_2 0,02 M.

3.4.1 Procedimiento

De manera esquemática el procedimiento de preparación de microesferas se resume a continuación:

1. Verter la fase acuosa interna (W_1) sobre la oleosa (O) y homogeneizar en vórtex (Genie 2, Scientific Industries) en la posición 10 durante 1 minuto.
2. A la emulsión formada añadir la segunda fase acuosa (W_2) y homogeneizar en vórtex en la posición 10 durante 30 segundos.

3. Inmediatamente verter esta fase en un vaso de precipitados de 250 ml que contiene 100 ml de CaCl_2 al 0,25 M y poner a agitación magnética durante 1,5 h para la evaporación del disolvente orgánico y completar el entrecruzamiento del alginato.

4. Una vez completado el tiempo, las microesferas se han formado y se procede a realizar una filtración a vacío (Filtro Milipore, tamaño de poro 0,45 μm). Se realizan varios lavados con agua y se continúa filtrando.

5. Finalmente se recogen las microesferas, se congelan a -20°C y se liofilizan.

3.5. Evaluación de la capacidad de encapsulación de las microesferas

La cantidad de goserelina incorporada en las microesferas se cuantificó mediante un método de extracción aceite/agua. Para ello, se tomaron muestras por triplicado de cada formulación y se siguió el protocolo que se indica a continuación.

3.5.1. Procedimiento

1. Disolver cada muestra en 0,5 ml de DCM.
2. Tras su completa disolución, añadir 2 ml de agua y mezclar ambas fases en el vórtex.
3. Esperar hasta que se produzca la separación de las fases y la consiguiente precipitación del polímero.
4. Recoger una alícuota de la fase acuosa, en la que se encuentra la proteína, para determinar su concentración por microBCA,

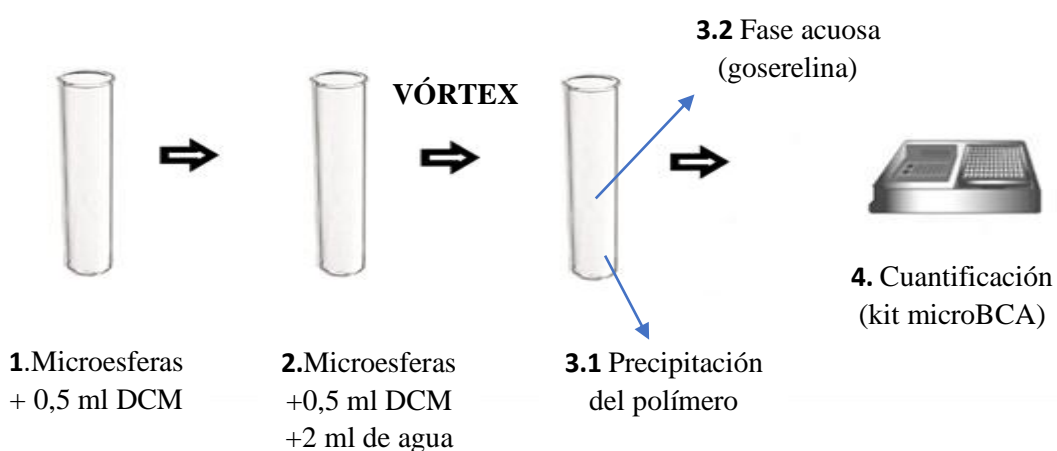


Figura 3. Esquema del proceso de extracción de la goserelina.

Como consecuencia, en la determinación de la eficacia de encapsulación debemos tener en cuenta que la concentración hallada nos permite calcular la cantidad de goserelina encapsulada. Por lo tanto, debemos compararla con la cantidad utilizada para la preparación de las microesferas que se corresponde con el 100%.

3.6 Evaluación de los perfiles de liberación

Los perfiles de liberación de las diferentes formulaciones nos permiten estudiar la cinética de liberación del fármaco y la influencia en la misma de los componentes de la formulación.

3.6.1. Procedimiento

- 1.** Tomar muestras de cada formulación por triplicado.
- 2.** Cada muestra se incuba en 3 ml de tampón fosfato a 37 °C en agitación constante en un baño oscilante (25 rpm, PJ Selecta, España). Cada 24 horas, las muestras se centrifugan a 4.000 rpm (Beckman Coulter, Estados Unidos) durante 5 minutos con el objetivo de sedimentar las microesferas. Posteriormente, se recoge el sobrenadante en su totalidad y se almacena a -20 °C para la posterior cuantificación de proteína liberada usando el kit microBCA.
- 3.** Finalmente, para continuar evaluando la liberación, es necesario reponer el medio, por lo tanto, se añaden 3 ml de tampón fosfato fresco y las muestras resuspendidas son de nuevo colocadas en el baño oscilante a 37 °C.

4. Resultados

4.1. Puesta a punto del método de valoración de la goserelina por microBCA.

Recta de calibrado de la goserelina y albúmina

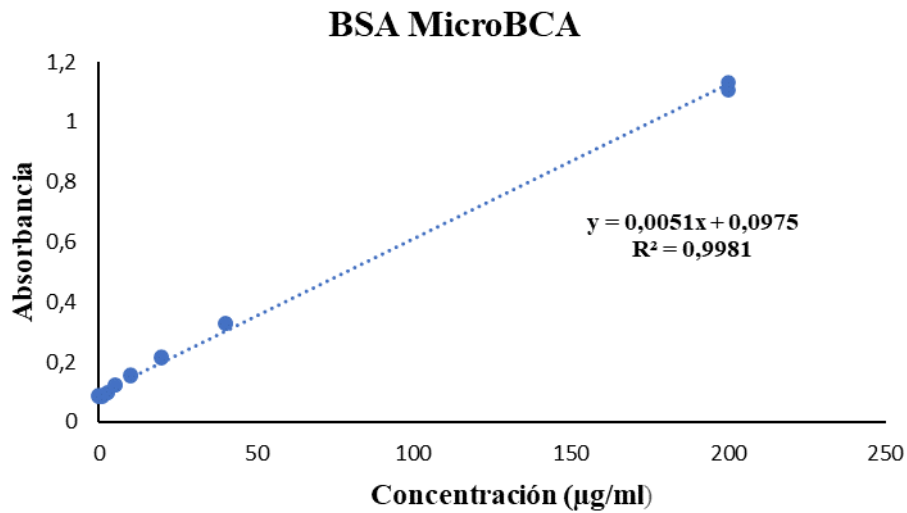


Figura 4. Recta de calibrado BSA en tampón fosfato pH 7,4.

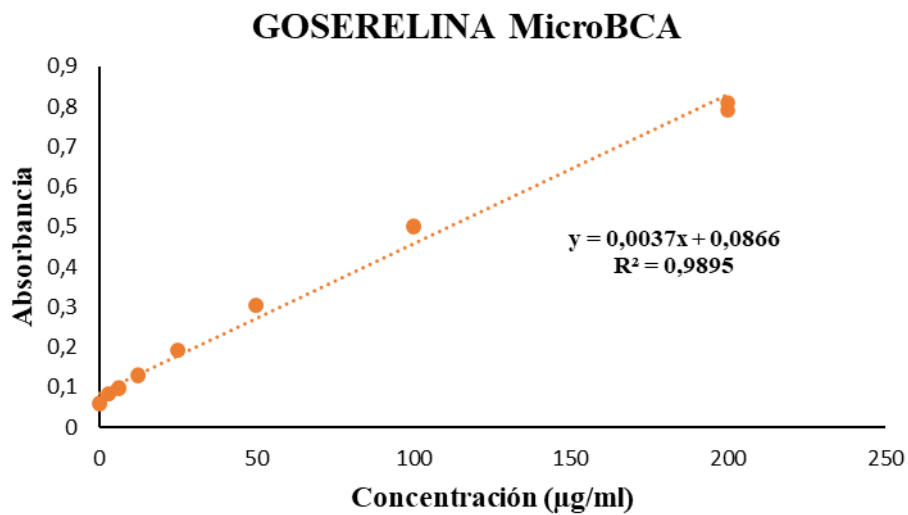


Figura 5. Recta de calibrado goserelina en tampón fosfato pH 7,4.

Con relación al coeficiente de correlación de las rectas, podemos observar que ambas presentan un valor similar (0,998 vs 0,989), por lo que existe una dependencia lineal de la concentración con respecto a la absorbancia.

4.2. Relación entre goserelina y albúmina

Podemos establecer la relación que tiene la goserelina frente a la albúmina. Con los datos experimentales, a partir de la relación entre las pendientes de ambas rectas de calibrado, concluimos que esta relación es 0,725 veces inferior para la goserelina frente a la albúmina.

4.3. Capacidad de encapsulación

Los datos relativos a la cantidad de goserelina encapsulada se presentan como μg goserelina/mg microesferas para estandarizar el efecto de los diferentes pesos de las muestras utilizadas.

La eficacia de encapsulación se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$EE = \frac{\text{cantidad de goserelina encapsulada } (\mu\text{g})}{\text{cantidad de goserelina teórica } (\mu\text{g})} \times 100$$

Formulaciones	Concentración Media ($\mu\text{g/ml}$)	(μg) goserelina/ (mg) microesferas	Eficacia de encapsulación (%)
Formulación 1	4,20 \pm 0,758	0,839 \pm 0,152	84,1 \pm 15,8
	4,02 \pm 0,253	0,975 \pm 0,0613	
	2,32 \pm 0,505	1,21 \pm 0,274	
Formulación 2	2,86 \pm 0,379	0,571 \pm 0,0758	52,0 \pm 6,19
	3,57 \pm 0,126	0,676 \pm 0,0239	

Tabla 1. Cantidad de goserelina ($\mu\text{g/mg}$) encapsulada y eficacia de encapsulación promedio de las diferentes formulaciones.

4.4 Perfiles de liberación

Para estudiar la cinética de liberación, se realizó una nueva recta de calibrado en el medio de césion utilizado, para controlar las posibles variaciones entre días o entre ensayos y optimizar así al máximo el ensayo. Teniendo en cuenta la cantidad de goserelina empleada en la elaboración de las microesferas (300 μg), el intervalo de concentraciones a considerar en la recta de calibrado se acotó a 0-12,5 $\mu\text{g/ml}$ para evaluar de una manera más precisa los datos.

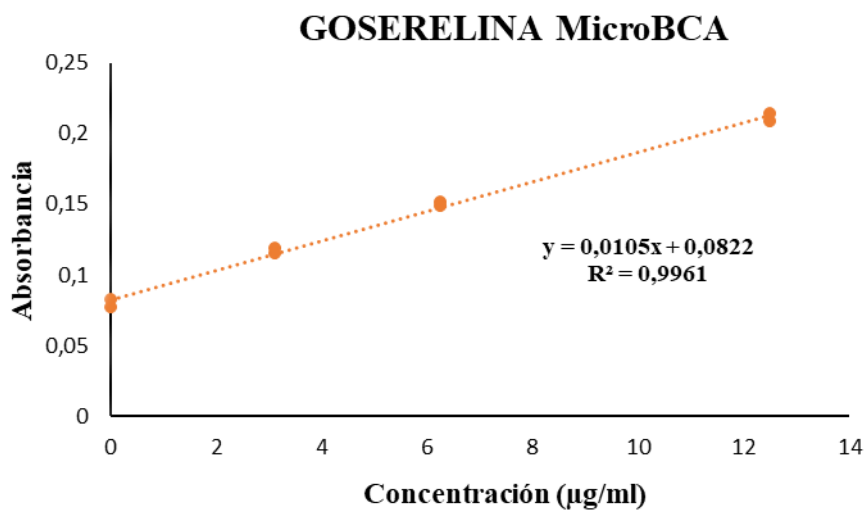


Figura 6. Recta de calibrado goserelina en tampón fosfato (pH 7,4) utilizada en el ensayo de liberación.

El ensayo de liberación nos permite conocer el porcentaje de goserelina liberada con respecto a la carga a lo largo del tiempo; la representación acumulada se refleja en la figura 7.

Días	Cantidad liberada formulación 1 (µg)	Cantidad liberada formulación 2 (µg)
1	3,80±3,43	12,7±0,359
2	6,39±0,909	15,4±0,297
3	6,86±1,58	15,5±0,397
4	6,86±1,58	17,3±0,365
5	7,07±3,23	18,4±1,10
6	7,79±4,11	19,4±2,85
7	9,56±2,24	20,9±3,11

Tabla 2. Cantidad (µg) promedio liberada acumulada en las diferentes formulaciones en tampón fosfato. N=3

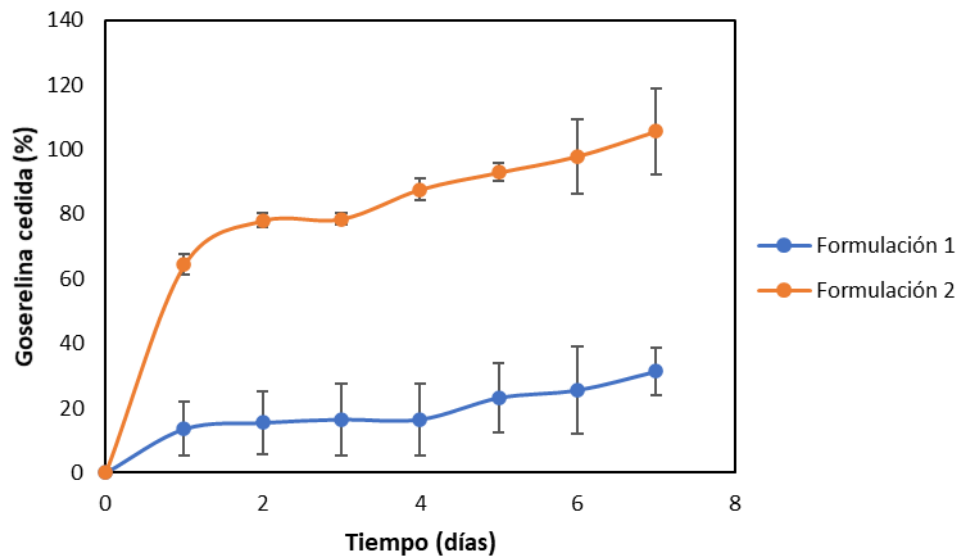


Figura 7. Comparación de los perfiles de liberación de ambas formulaciones. Curva acumulada de los porcentajes cedidos en tampón fosfato. $N=3$

5. Discusión

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la goserelina se puede encapsular en las microesferas diseñadas con un rendimiento de encapsulación aceptable, teniendo en cuenta que se trata de una proteína de pequeño tamaño altamente hidrosoluble. Sin embargo, habrá que optimizar el método y comprobar el efecto de la adición de alginato en la fase interna acuosa. Según nuestra hipótesis de partida, el alginato al unirse a las proteínas por interacción de su carga negativa con la positiva de las mismas debería favorecer su retención en el sistema. Contrariamente a lo esperado el rendimiento de encapsulación fue mayor en las microesferas elaboradas sin alginato (formulación 1: $\approx 80\%$) que en las microesferas con alginato ($\approx 50\%$). La explicación para este resultado podría ser que el alginato al ser una molécula muy grande y poseer gran hidrofilia, si la concentración utilizada es muy elevada puede pasar a la fase externa acuosa arrastrando así a la goserelina y creando grandes poros en la estructura de las microesferas. Esto también se vería facilitado por un proceso de entrecruzamiento del alginato insuficiente. Desgraciadamente, debido a la situación actual no se pudo acceder al microscopio electrónico para comprobar esta teoría, si bien los resultados obtenidos del ensayo de liberación apoyan esta justificación. La cesión de la goserelina es mucho más rápida desde las microesferas con alginato, en aproximadamente una semana se ha liberado la totalidad de la dosis encapsulada frente a las microesferas elaboradas solamente con PLGA que han cedido aproximadamente un 30% de su contenido (Figura 7).

Por último, nuestros resultados indican que regulando la concentración de alginato en la fase interna acuosa y probablemente optimizando la concentración de Ca_2Cl para entrecruzar todo el alginato disponible podremos mejorar el rendimiento de encapsulación y probablemente también modular la cinética de liberación de la goserelina.

Tal como hemos mencionado este es un trabajo preliminar y debemos repetir los experimentos para comprobar si nuestros resultados se replican pues por las circunstancias actuales no nos ha sido posible.

De cualquier manera, nuestras formulaciones son útiles para la administración local de goserelina en miomas. El desarrollo de nuevos sistemas de administración implica estudios *in vitro* y ensayos *in vivo* en animales de experimentación. Para los estudios *in vitro* el equipo de investigación en el que se ha realizado este trabajo ya ha desarrollado un modelo de mioma humano que se mantiene en cultivo durante 1 semana, por lo que las microesferas elaboradas con alginato (formulación 2) presentarían una liberación adecuada para comprobar el efecto de la goserelina empleando este modelo. Por otro lado, las microesferas de PLGA (formulación 1)

liberan un 30% en una semana, por lo que si extrapolamos supone que en aproximadamente 1 mes se liberaría el 100%, resultando ideales para su aplicación *in vivo*.

6. Conclusiones

1. La presencia de alginato en la fase interna acuosa parece modificar la velocidad de liberación de la goserelina desde las microesferas.
2. Es necesario optimizar la concentración de alginato y de Ca_2Cl en las fases acuosas para mejorar el rendimiento de encapsulación de la goserelina destinada a los estudios *in vitro*.
3. La formulación elaborada sin alginato podría ser candidata para los estudios *in vivo*.

7. Bibliografía

1. Yang Y, Chen Q, Lin J, Cai Z, Liao G, Wang K et al. Recent Advance in Polymer Based Microspheric Systems for Controlled Protein and Peptide Delivery. *Curr Med Chem.* 2019; 26(13):2285-2296.
2. Hirota K, Doty AC, Ackermann R, Zhou J, Olsen KF, Feng MR et al. Characterizing release mechanisms of leuprolide acetate loaded PLGA microspheres for IVIVC development I: In vitro evaluation. *J Controlled Release.* 2016;244:302-313.
3. Qi P, Bu R, Zhang H, Ying J, Chen J, Zhang A et al. Goserelin Acetate Loaded Poloxamer Hydrogel in PLGA Microspheres: Core-Shell Di-Depot Intramuscular Sustained Release Delivery System. *Mol Pharmaceutics.* 2019;16:3502.
4. Oesterling JE. LHRH agonists. A nonsurgical treatment for benign prostatic hyperplasia. *J Androl.* 1991;12:381-388.
5. Sun W, Zhang X, Wang T, Leng G, Sun K, Li Y, Liu W. Goserelin sustained release microsphere pharmaceutical composition. EP 2 987 484 A1. 2016. European Patent Office.
6. Garrido Fuente E. Mioma Uterino: Aproximación a un Tratamiento Médico Eficaz con Análogos Agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas Hipofisarias. Universidad Complutense De Madrid; 2005.
7. Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M et al. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African American women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1752-1756.
8. Fábregues F, Peñarrubia J. Mioma uterino. Manifestaciones clínicas y posibilidades actuales de tratamiento conservador. *Med Integral.* 2002;40(5):190-195.
9. Flierman PA, Oberyé JJ, van der Hulst VP, de Blok S. Rapid reduction of leiomyoma volume during treatment with the GnRH antagonist ganirelix. *BJOG.* 2005;112:638-642.
10. Malik M, Britten J, Cox J, Patel A, Catherino WH. Gonadotropin-releasing hormone analogues inhibit leiomyoma extracellular matrix despite presence of gonadal hormones. *Fertil Steril.* 2016;105(1):214-224.
11. Stewart EA. Clinical practice. Uterine fibroids. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1646-1655.
12. Sáez V, Hernández JR, Peniche C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnol Apl.* 2007;24:98-107.
13. Khanna O, Larson JC, Moya ML, Opara EC, Brey EM. Generation of Alginate Microspheres for Biomedical Applications. *J Vis Exp.* 2012;66.
14. Guo Y, Yang Y, He L, Sun R, Pu C, Xie B et al. Injectable Sustained-Release Depots of PLGA Microspheres for Insoluble Drugs Prepared by Hot Melt Extrusion. *Pharm Res.* 2017; 34:2211-2222.
15. Diem K. *Documenta Geigy Scientific Tables.* 5th.ed. Basle, Switzerland: Geigy Pharmaceuticals;1958.

16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*1951;193:265-275.
17. García-García P, Reyes R, Pérez-Herrero E, Arnau MR, Évora C, Delgado A. Alginate-hydrogel versus alginate-solid system. Efficacy in bone regeneration in osteoporosis. *Mater Sci Eng C.* 2020 (en prensa).